



Etude des interactions entre enzymes immobilisées et inhibiteurs au moyen des radiotraceurs. Application à la réalisation d'électrodes enzymatiques pour le dosage des composés toxiques

René Guyonnet

► To cite this version:

René Guyonnet. Etude des interactions entre enzymes immobilisées et inhibiteurs au moyen des radiotraceurs. Application à la réalisation d'électrodes enzymatiques pour le dosage des composés toxiques. Physique Nucléaire Expérimentale [nucl-ex]. Université Claude Bernard - Lyon I, 1978. Français. NNT: . tel-01026474

HAL Id: tel-01026474

<https://theses.hal.science/tel-01026474>

Submitted on 21 Jul 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON I

pour obtenir

LE DOCTORAT DE SPECIALITE (3è Cycle)

en PHYSIQUE (PHYSIQUE NUCLEAIRE)

par

René GUYONNET

ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE ENZYMES IMMOBILISEES ET INHIBITEURS
AU MOYEN DES RADIOTRACEURS

APPLICATION A LA REALISATION D'ELECTRODES ENZYMATIQUES
POUR LE DOSAGE DES COMPOSES TOXIQUES

==
==
==

Soutenue le 5 Décembre 1978 devant la Commission d'Examen

MM.

J. TOUSSET

Président

M. PORTHULT

M. SOUSTELLE

F. LANCELOT

C. TRAN MINH

Examineurs

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON I

pour obtenir

LE DOCTORAT DE SPECIALITE (3è Cycle)

en PHYSIQUE (PHYSIQUE NUCLEAIRE)

par

René GUYONNET

ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE ENZYMES IMMOBILISEES ET INHIBITEURS
AU MOYEN DES RADIOTRACEURS

APPLICATION A LA REALISATION D'ELECTRODES ENZYMATIQUES
POUR LE DOSAGE DES COMPOSES TOXIQUES

=====
=====

Soutenue le 5 Décembre 1978 devant la Commission d'Examen

MM.

J. TOUSSET

Président

M. PORTHAULT

M. SOUSTELLE

F. LANCELOT

C. TRAN MINH

Examineurs

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président honoraire : M. le Pr J. BOIDIN

Président : M. le Pr D. GERMAIN

Premier Vice-Président : M. le Pr E. ELBAZ

Deuxième Vice-Président : M. ROUSSET, Attaché de Recherche

Troisième Vice-Président : M. BRULA, Etudiant

Secrétaire Général de l'Université : M. J. RAMBAUD, Administrateur Civil

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE (U.E.R.)

U.E.R. de Médecine GRANGE-BLANCHE	: Monsieur Bernard SALLE, M.C.A.
U.E.R. de Médecine ALEXIS-CARREL	: Monsieur le Pr René MORNEX
U.E.R. de Médecine LYON-NORD	: Monsieur NEIDHART, M.C.A.
U.E.R. de Médecine SUD-OUEST	: Monsieur le Pr Jean NORMAND
U.E.R. de Sciences Pharmaceutiques	: Monsieur le Pr C.A. BIZOLLON
U.E.R. de Techniques de Réadaptation	: Monsieur Alain MORGON, M.C.A.
U.E.R. de Biologie Humaine	: Monsieur Jean-Pierre REVILLARD, M.C.A.
U.E.R. I.R.E.P.S.	: Monsieur Albert MILLON, Professeur d'E.P.S.
U.E.R. de Sciences Odontologiques	: Monsieur le Dr Roger VINCENT
U.E.R. de Mathématiques	: Monsieur le Pr PICARD
U.E.R. de Physique	: Monsieur le Pr Jean DELMAU
U.E.R. de Chimie-Biochimie	: Monsieur le Pr Jean HUET
U.E.R. des Sciences de la Nature	: Monsieur le Pr René GINET
U.E.R. de Sciences Physiologiques	: Mle le Pr J.F. WORBE
U.E.R. de Physique Nucléaire	: Monsieur le Pr Mark GUSAKOW
I.U.T. I	: Monsieur le Pr Albert VILLE
I.U.T. II	: Monsieur J. GALLET, Directeur E.N.S.A.M.
Observatoire de LYON	: Monsieur Guy MONNET, Astronome Adjoint
U.E.R. de Mécanique	: Mademoiselle le Pr Geneviève COMTE-BELLOT

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie Physique des Solutions de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne et au Laboratoire des Isotopes du Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Saint-Etienne.

Je souhaite exprimer ma gratitude à Monsieur le Professeur M. SOUSTELLE pour l'accueil qu'il m'a réservé au Centre de Chimie Physique de l'Ecole des Mines, et pour avoir accepté de juger ce travail.

Que Monsieur C. TRAN MINH Maître de Recherche qui en a assuré la direction trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur J. TOUSSET pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. C'est aussi l'occasion de lui témoigner ma profonde reconnaissance pour son enseignement qui suscita en moi l'attrait pour la Recherche.

Je suis très honoré par l'intérêt que Monsieur le Professeur M. PORTHAULT a bien voulu porter à cette étude en acceptant de faire partie de mon jury.

Mes remerciements vont également à Monsieur F. LANCELOT, Maître de Recherche pour l'attention qu'il a bien voulu me témoigner au cours de ce travail et pour avoir accepté de le juger.

Ma reconnaissance s'adresse aussi à Madame M. VINDIMIAN, Ingénieur au Laboratoire des Isotopes du Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Saint-Etienne sans qui cette étude n'aurait pu voir le jour.

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans la collaboration technique de tout le personnel du Centre de Chimie Physique. Que Mesdames M.C. MATHAIS, D. CHAVANNE, Monsieur R. MASSARDIER trouvent ici l'expression de ma sincère gratitude pour leur aide spontanée et efficace.

Je remercie également Monsieur le Professeur FRAY et ses collaborateurs du Laboratoire de Biochimie de la Faculté de Médecine de Saint-Etienne d'avoir bien voulu m'accueillir dans leur Service et mettre à ma disposition leur appareillage.

Enfin, ce travail de recherche est aussi le fruit d'une équipe unie. Que mes camarades chercheurs D. VALLIN et J. BEAUX trouvent ici mes sincères remerciements et le témoignage de ma profonde amitié.

ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE ENZYMES IMMOBILISEES
ET INHIBITEURS AU MOYEN DES RADIOTRACEURS

APPLICATIONS A LA REALISATION D'ELECTRODES ENZYMATIQUES
POUR LE DOSAGE DES COMPOSES TOXIQUES

SOMMAIRE

I - INTRODUCTION

II - RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

II-1 - RAPPEL CINETIQUE DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE EN SOLUTION

II-2 - FACTEURS INFLUENCANT LA VITESSE D'UNE REACTION ENZYMATIQUE

II-3 - RAPPEL DE LA CINETIQUE ENZYMATIQUE EN PRESENCE D'INHIBITEURS

II-3-1 - *Inhibition compétitive*

II-3-2 - *Inhibition non compétitive*

II-3-3 - *Inhibition incompétitive*

II-4 - DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES ENZYMES UTILISEES

II-4-1 - *Uréase*

II-4-2 - *Acétylcholinestérase*

III - MATÉRIEL ET MÉTHODES

III-1 - IMMOBILISATION DE L'ENZYME

III-2 - ELECTRODES ENZYMATIQUES

III-2-1 - *Electrode à uréase*

III-2-2 - *Electrode à cholinestérase*

III-3 - METHODES NUCLEAIRES

III-3-1 - Emetteurs γ

III-3-2 - Emetteurs β

III-3-2-1 - Etude de diffusion des substrats : mesure en scintillation liquide

- dispositif expérimental
- mesure de diffusion

III-3-2-2 - Détection des organophosphorés marqués au ^{32}P par effet Cerenkov

- rappel
- matériel et dispositif expérimental
- étalonnage - coefficient d'efficacité - quenching

IV - RÉSULTATS

IV-1 - REPONSE DES ELECTRODES ENZYMATIQUES AUX SUBSTRATS

IV-1-1 - Electrode à uréase

IV-1-2 - Electrode à Acétylcholinestérase

IV-2 - ETUDE DES INHIBITEURS REVERSIBLES

IV-2-1 - Action de la nicotine et de l'arginine

IV-2-2 - Action des carbamates

- influence du pH
- influence du temps de séjour de l'enzyme dans la solution d'albumine
- influence du temps d'incubation

IV-2-3 - Action du fluor

IV-3 - ETUDE DES INHIBITEURS IRREVERSIBLES

IV-3-1 - Action des ions métalliques

- action du mercure sur l'uréase
- action de l'argent sur l'uréase
- fixation des ions métalliques en fonction du pH
- inhibition de la cholinestérase par les ions métalliques

IV-3-2 - Action des organophosphorés

- étude de la cinétique d'inhibition de l'AChE immobilisée
- réactivation artificielle de la membrane inhibée
- influence du pH
- étude de la régénération spontanée de la membrane enzymatique

IV-4 - ETUDE THEORIQUE D'UN MODELE SIMULANT LE COMPORTEMENT D'UN CAPTEUR ENZYMATIQUE

- IV-4-1 - Etude de la cinétique enzymatique en phase hétérogène
- IV-4-2 - Etude de l'inhibition en phase hétérogène
- IV-4-3 - Conditions de fonctionnement des électrodes enzymatiques en capteurs
 - électrode sensible au substrat
 - électrode sensible à l'inhibiteur
- IV-4-4 - Vérifications expérimentales

IV-5 - APPLICATION : CAPTEURS POUR LE DOSAGE DE COMPOSES TOXIQUES

- IV-5-1 - Capteurs pour le dosage des ions métalliques
- IV-5-2 - Capteurs des parasymphicomimétiques et des pesticides

V - CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

I - INTRODUCTION

La vie de l'organisme et de la cellule se développe grâce aux réactions chimiques régies et contrôlées par des catalyseurs biologiques : les enzymes. Leur nature protéique explique leur spécificité et l'efficacité avec lesquelles elles transforment les "substrats" en "produits" de la réaction. Grâce à ces caractères, elles participent à la régulation de l'activité des chaînes métaboliques dont le mécanisme est souvent fort complexe. Cette activité est soumise en permanence à l'action de substances dites "effecteurs" pouvant agir comme activateur, ou comme inhibiteur (1). Cela fait dire à G. GACHELIN qu'"une substance, utilisée en médecine n'a de propriétés pharmacologiques que parce que, directement ou indirectement, elle modifie le fonctionnement d'une enzyme ou d'un système d'enzymes". La majorité des études visant à comprendre les mécanismes d'action de ces substances pouvant avoir un effet thérapeutique ou toxique sur l'organisme ont été seulement menées in-vitro sur des enzymes isolées en solution. Or il est maintenant reconnu que la plupart des enzymes in-vivo agissent non pas à l'état libre, mais à l'état fixé dans les membranes des organismes intracellulaires (2) (3) (4). De même dans les sols les enzymes agissent à l'état fixé aux composés argileux et humiques (5). Aussi les résultats des études des enzymes en solution ne peuvent être transposés directement au milieu vivant, car la structure du support, l'influence du micro-environnement conditionnent toute l'activité enzymatique.

Depuis quelques années l'immobilisation des enzymes a suscité un grand nombre de travaux de recherche car d'un point de vue pratique l'exploitation de leur surprenante efficacité catalytique permet un grand nombre d'applications industrielles, que ce soit en chimie de synthèse, dans l'industrie alimentaire, ou dans le domaine médical. Le souci essentiel de la recherche a été de les faire travailler au maximum de leur rendement pour catalyser la transformation, parfois très spécifique du substrat (6). D'un point de vue théorique l'immobilisation des enzymes présente un grand intérêt car elle permet de réaliser artificiellement des conditions qui se rapprochent le plus possible de celles que l'on trouve dans les organismes vivants.

Le but de ce travail est d'élaborer un modèle capable de traduire l'activité des enzymes *in vivo* en présence de certains effecteurs, en particulier inhibiteurs. Pour cette raison, une méthode expérimentale utilisant des membranes à enzymes immobilisées a été mise au point afin de donner une approche plus réelle du phénomène biologique que celle donnée par les essais effectués jusqu'à maintenant avec des enzymes en solution. Nous avons choisi deux enzymes : l'uréase dont l'isolation est facile et le comportement en solution est bien connu et la cholinestérase, enzyme participant à la transmission de l'influx nerveux afin de reproduire un phénomène physiologique, notamment l'empoisonnement.

Nous abordons l'étude par un rappel bibliographique de la catalyse enzymatique en solution homogène en l'absence et en présence d'inhibiteurs. Nous décrirons ensuite les techniques utilisées pour immobiliser les enzymes, les électrodes enzymatiques que nous avons réalisées pour suivre l'activité des enzymes greffées et l'utilisation des radiotraceurs γ et β permettant le marquage des inhibiteurs et d'en déduire leur interaction avec les enzymes utilisées. Nous donnons ensuite les résultats sur la réponse des électrodes enzymatiques d'abord en présence du substrat puis en présence des inhibiteurs. Dans le cas des inhibiteurs réversibles nous montrerons qu'il est possible de les doser de manière analogue à celle d'un substrat. Pour les inhibiteurs irréversibles, une étude sur la régénération de l'enzyme au moyen d'agents complexants s'avère nécessaire pour leur dosage. Cette étude nous amènera à nous intéresser au mécanisme de la régénération spontanée de l'acétylcholinestérase, mécanisme non prouvé jusqu'à ce jour et que nous avons pu démontrer à l'aide des radiotraceurs utilisant l'effet Cerenkov. Nous avons ensuite réalisé un modèle permettant d'expliquer le comportement des électrodes enzymatiques en présence des inhibiteurs. Cette étude débouche sur la réalisation de capteurs enzymatiques permettant le dosage des drogues, des métaux lourds ainsi que des insecticides et des pesticides.

II - RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

La connaissance des poisons est fort ancienne. Si les premières intoxications observées ont eu pour origine la consommation, par ignorance ou par méprise de végétaux vénéneux, il semble que les premiers toxiques utilisés aient servi à empoisonner des flèches destinées à la chasse ou à la guerre. Le terme de toxique dérive d'ailleurs du mot grec "toxon" qui signifie "arc". L'utilisation durant la première Guerre Mondiale du fameux "gaz moutarde", jusqu'aux "Nerve Gases" et aux défoliants confirment que l'humanité s'est toujours préoccupée de trouver des moyens de tuer. De l'exécution de Socrate à la ciguë, à la Reine Catherine de Médicis qui fabriquait elle même ses poisons dans son cabinet secret de Blois, on peut dire que la toxicologie classique a conduit aux premières études des inhibiteurs enzymatiques.

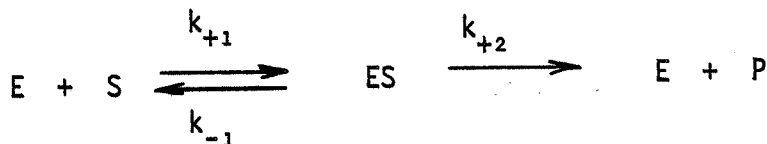
La cinétique d'inhibition produite par une substance se liant réversiblement avec une enzyme fut développée dans une publication originale de MICHAELIS et MENTEN en 1913, mais il fallut attendre un certain nombre d'années avant que ce type d'inhibition fut caractérisé. L'isolement et la purification partielle de la première enzyme l'Uréease en 1926 par SUMMER fut l'étape déterminante pour la suite, car les études de l'inhibition de l'enzyme en solution devenaient alors possible. En 1930 alors que COOK démontrait expérimentalement le mécanisme de l'inhibition compétitive énoncée 17 ans plus tôt par MICHAELIS et MENTEN, à la même époque HALDANE établissait un autre type d'inhibition qu'il nommait "non compétitif".

Depuis SUMMER les études portant sur l'inhibition de l'enzyme en solution ou de suspension de cellules sont considérables et de grands noms restent attachés (WILSON, ALDRIDGE, NACHMANSON, MONOD). C'est sur ces travaux fondamentaux que reposent encore aujourd'hui les bases de l'enzymologie classique.

II-1 - RAPPEL CINETIQUE DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE EN SOLUTION

La première approche mathématique satisfaisante sur la cinétique de la catalyse enzymatique revient à HENRI ⁽⁷⁾ et MICHAELIS et MENTEN ⁽⁸⁾ qui supposèrent la formation préliminaire d'un complexe entre l'enzyme et le substrat. Plus tard BRIGGS et HALDANE ⁽⁹⁾ généralisèrent cette théorie par l'hypothèse de l'état stationnaire.

Dans le cas général où l'enzyme transforme irréversiblement son substrat en produit, l'expression de la vitesse peut être exprimée d'une manière simple à partir du schéma réactionnel suivant :



où E	représente	l'enzyme
S	"	le substrat
ES	"	le complexe enzyme-substrat
P	"	le produit ou les produits
k_{+1}, k_{-1}, k_{+2}	"	les constantes de vitesse

Dans l'hypothèse de l'état stationnaire :

$$\left(\frac{d[ES]}{dt} = 0\right)$$

et en posant $V_m = k_{+2}[E_0]$ et $K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$ (constante de MICHAELIS)

la vitesse de la réaction enzymatique s'exprime par l'équation ⁽¹⁰⁾ :

$$V = V_m \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Pour un système enzymatique donné, la vitesse de la réaction est fonction du rapport $\frac{[S]}{K_m}$

- si $\frac{[S]}{K_m} \ll 1$, $v \approx \frac{V_m}{K_m} \cdot [S]$: la cinétique est du premier ordre par rapport au substrat S.
- si $\frac{[S]}{K_m} \gg 1$, $v \approx V_m$: la cinétique est d'ordre zéro.

Ce modèle réactionnel ne prend en considération qu'un substrat et qu'un produit, et décrit comme irréversible l'étape de décomposition du complexe enzyme substrat, ce qui lui vaut d'être critiqué par les théoriciens de la cinétique enzymatique phénoménologique ALBERTY, RICARD ⁽²⁾ qui lui reprochent d'être en violation avec le principe de "réversibilité microscopique" ⁽¹⁴⁾. Certes si toutes les étapes sont définies comme réversibles, on peut rendre compte de l'effet inhibiteur des produits sur la réaction. Dans la plupart des cas cependant le modèle de HENRI bien que théoriquement "incorrect" est adopté. L'irréversibilité en tant qu'approximation permet de traduire d'une manière simple et satisfaisante la réalité.

II-2 - FACTEURS INFLUENÇANT LA VITESSE D'UNE REACTION ENZYMATIQUE

La vitesse d'une réaction enzymatique est affectée par un certain nombre de paramètres tels que le pH et la température : la température augmente la vitesse de la réaction mais quand elle dépasse une certaine température critique, elle fait chuter cette vitesse par suite de la dénaturation de l'enzyme. Quant au pH, il existe un pH optimal correspondant à une vitesse maximale de la réaction enzymatique. On attribue ce phénomène à un état d'ionisation à la fois en substrat S et de l'enzyme E compatible avec la formation du complexe ES.

A part le pH et la température, un grand nombre de substances appelées effecteurs peuvent agir sur l'activité enzymatique. Parmi ces effecteurs, les inhibiteurs sont les plus importants. Ils peuvent être réversibles ou irréversibles suivant que l'enzyme peut ou non être régénérée spontanément en l'absence d'inhibiteur.

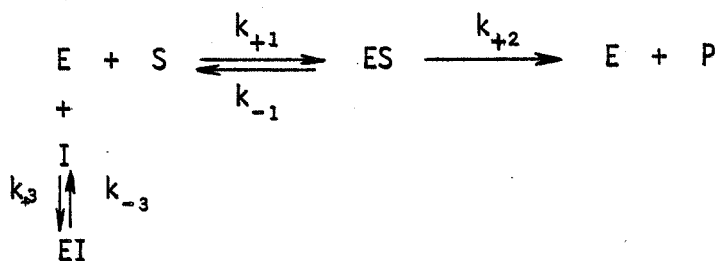
II-3 - RAPPEL DE LA CINETIQUE ENZYMATIQUE EN PRESENCE D'INHIBITEURS REVERSIBLES

Le traitement suivant concerne le cas simple des enzymes monomériques à un seul substrat, ne pouvant établir qu'un seul type d'interaction avec l'inhibiteur.

L'étude de la cinétique enzymatique en solution en présence des inhibiteurs réversibles a permis de classer ces inhibiteurs suivant leur mode d'action.

II-3-1 - INHIBITION COMPETITIVE

Dans le cas où l'inhibiteur est un analogue chimique du substrat, on constate souvent que son effet est diminué, voire aboli, par une augmentation de la concentration en substrat ; ce comportement est assimilable à une sorte de compétition entre l'inhibiteur et le substrat pour le centre actif. Si l'on suppose que l'inhibiteur peut former un complexe réversible EI avec l'enzyme au niveau du centre actif. On a le schéma suivant :



On voit que l'inhibition conduit à la formation d'un complexe improductif : EI avec une constante de dissociation :

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{k_{-3}}{k_{+3}}$$

[I] et [EI] étant les concentrations de l'inhibiteur et du complexe respectivement.

On démontre qu'en présence de l'inhibiteur, la vitesse de réaction devient :

$$v' = \frac{V_m [S]}{[S] + K_m (1 + \frac{[I]}{K_i})}$$

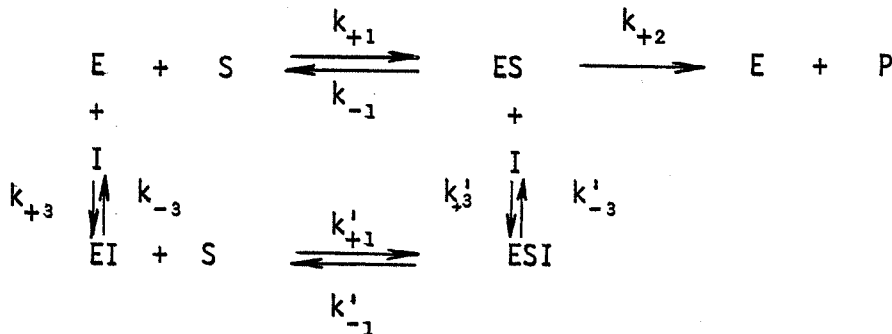
cette équation de vitesse est analogue à celle de MICHAELIS où K_m est remplacé par :

$$K'_m = K_m (1 + \frac{[I]}{K_i})$$

Tout se passe donc comme si l'affinité du substrat pour l'enzyme était diminuée par la présence de l'inhibiteur. Par contre si $[S]$ est très élevé par rapport à $[I]$, le terme $\frac{[I]}{K_i}$ devient négligeable, la vitesse maximum est donc la même que pour la réaction sans inhibiteur: l'augmentation de la concentration en substrat tend à annuler l'effet de l'inhibiteur.

II-3-2 - INHIBITION NON COMPETITIVE :

Si l'inhibiteur se fixe en un endroit éloigné du centre actif, il n'y a donc pas d'effet de compétition entre le substrat et l'inhibiteur, et on peut écrire :



Si on suppose que $k_{+1} \approx k'_{+1}$, $k_{-1} \approx k'_{-1}$, $k_{+3} \approx k'_{+3}$ et $k_{-3} \approx k'_{-3}$, on a :

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \approx \frac{[ES][I]}{[ESI]} \text{ et } K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} \approx \frac{[EI][S]}{[EIS]}$$

En présence de l'inhibiteur, la vitesse de réaction enzymatique devient :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_m [S]}{(K_m + [S]) (1 + \frac{[I]}{K_i})}$$

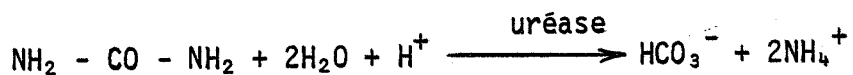
ainsi un inhibiteur incompétitif réduit à la fois K_m et V_m d'un même facteur $(1 + \frac{[I]}{K_i})$. Selon la désignation de MONOD une telle inhibition peut être désignée de "type KV".

II-4 - DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES ENZYMES UTILISEES

L'uréase et la cholinestérase ont été choisies pour notre étude. Nous donnons un rappel de leurs caractéristiques.

II-4-1 - UREASE

L'uréase est tirée de fève JACK (*Canavalia Ensiformis*) et a été la première enzyme isolée à l'état cristallisé (J.B. SUMMER 1926). Elle appartient au groupe des amidases, c'est-à-dire qui scinde les liaisons amides - CO - NH -. Chez l'homme on signale sa présence seulement dans le suc gastrique (13). Elle catalyse exclusivement la décomposition de l'urée en carbonate d'ammonium selon la réaction (14) :



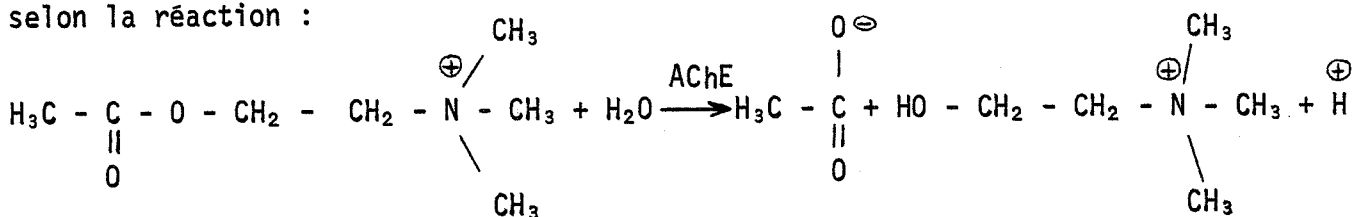
Sa masse moléculaire est d'environ 483 000 et sa constante de MICHAELIS K_m déterminée en solution est comprise entre $1.05.10^{-2}$ et 3.10^{-2} selon sa provenance et le pH (15).

L'inhibition de l'uréase en solution par les métaux lourds a été étudiée systématiquement par SHAW et RAVAL (19) (20), et de nombreux auteurs ont tenté de dresser une classification de ces métaux tels que l'argent, le mercure, le cuivre, le cobalt ... etc en fonction de leur pouvoir d'inhibition sur cette enzyme (21) (22).

II-4-2 - L'ACETYLCHOLINESTERASE (AChE)

C'est à propos de l'étude du mécanisme d'action de cette enzyme qu'a été faite pour la première fois en 1950 l'hypothèse de la formation d'un acylenzyme intermédiaire (L.B. WILSON, F. BERGMANN et D. NACHMANSOHN) (23).

L'acétylcholinestérase ou cholinestérase vraie qu'on trouve dans les nerfs hydrolyse la liaison ester entre la choline et l'acétate de l'acétylcholine selon la réaction :



On trouve dans le plasma sanguin une choline-estérase de spécificité légèrement différente : elle hydrolyse mieux une chaîne acyl plus longue (butyrate). Elle est aussi appelée pseudo-cholinestérase.

L'AChE a été purifiée et cristallisée récemment à partir de l'organe électrique d'un poisson : le Gymnote et les études faites en microscopie électronique sur l'enzyme purifiée par chromatographie d'affinité ont montré trois formes moléculaires D, C et A composées respectivement de 3, 2 et 1 tétramères associées à une "queue" formant structure ⁽²⁴⁾. Toutes les formes de l'acétylcholinestérase possèdent le même K_m ⁽²⁵⁾ de l'ordre de $9 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ⁽²⁶⁾ à pH 7 et ne paraissent pas correspondre à des états catalytiquement distincts. Ce ne sont donc certainement pas des isoenzymes au sens strict.

L'acétylcholine est le neuro transmetteur responsable de la dépolarisation de la membrane synaptique et qui propage électriquement l'influx nerveux. L'acétylcholinestérase présent dans la membrane postsynaptique a pour rôle d'hydrolyser l'acétylcholine afin de repolariser cette membrane après le stimuli . Au niveau de l'organisme l'inhibition de l'AChE empêche donc la dégradation de l'acétylcholine produit par les premières impulsions nerveuses. Les impulsions suivantes qui arrivent provoquent un accroissement du taux d'acétylcholine conduisant d'abord à une surstimulation des nerfs, puis à la paralysie et à la mort par suite de défaillance respiratoire. On voit l'importance de l'étude de l'AChE immobilisée sous forme membranaire.

De nombreuses substances dites parasymphaticomimétiques sont utilisées en médecine pour bloquer temporairement l'action de la cholinestérase. Les organo chlorés et plus récemment les organophosphorés sont utilisés comme insecticides et d'autres, très volatils constituent une arme chimique des plus redoutables (Nerve Gase). Ainsi l'étude de cette enzyme présente un grand intérêt tant en recherche médicale avec les travaux de GOLDSTEIN-ALDRIDGE-WILSON-WHITTAKER ⁽²⁸⁾ ⁽²⁹⁾ ⁽³⁰⁾ ⁽³¹⁾ ⁽³²⁾ ⁽³³⁾ que dans l'industrie des insecticides et l'agriculture GIANG-GREEN-CASIDA-BAYER ⁽³⁴⁾ ⁽³⁵⁾ ⁽³⁶⁾ ⁽³⁷⁾ et même militaire ⁽³⁸⁾ ⁽³⁹⁾.

III - MATERIELS ET METHODES

Si l'on examine l'ensemble des études faites jusqu'à maintenant sur l'inhibition de ces deux enzymes, on est souvent surpris par certaines contradictions qui existent entre les différents travaux et les phénomènes physiologiques enregistrés. Ceci provient entre autre de deux causes :

- 1) L'enzyme évolue dans un milieu différent pour chaque méthode expérimentale (tampon, liquide biologique, serum, suspension de cellules).

- 2) Le système de détection permettant l'étude étant en phase homogène ne peut traduire la réalité d'une membrane enzymatique constituant d'un système hétérogène.

L'étude de l'inhibition des enzymes et son mécanisme de réversibilité entre l'enzyme et l'inhibiteur pose des problèmes avec les enzymes en phase soluble étant donné les difficultés pour transférer rapidement le système enzyme-inhibiteur d'un milieu réactionnel à un autre (nécessité d'une longue dialyse avec toujours des pertes d'activité enzymatique).

Aussi, comme le disait déjà VICTOR HENRI en 1906 : "Pour pouvoir analyser les lois d'action des ferments inclus à l'intérieur des cellules il est important de réaliser artificiellement des conditions qui se rapprochent le plus possible de celles que l'on trouve dans les organismes".

C'est ce que nous avons tenté de réaliser en élaborant un modèle expérimental basé sur trois principes :

- 1) fabrication d'une membrane enzymatique avec des matériaux pouvant simuler le plus possible une membrane biologique.

- 2) un système de détection simple au contact de la membrane capable de suivre en continu l'activité enzymatique de ce microenvironnement.

- 3) la possibilité d'identifier et de quantifier à tout moment la présence d'un inhibiteur, et pouvoir la relier à l'activité enzymatique sans détruire ni perturber le milieu.

III-1 - IMMOBILISATION DE L'ENZYME

Historiquement l'idée d'immobiliser une enzyme sur un support insoluble remonte à 1906, lorsque VICTOR HENRI ⁽⁴⁰⁾ publia son "étude sur l'invertine en milieu hétérogène". Il fallut attendre 1960 pour que à nouveau des équipes (KATCHALSKI ⁽⁴¹⁾ MANECKE ⁽⁴²⁾) s'intéressent à la fixation des enzymes. Dès lors l'intérêt suscité par les enzymes immobilisées a cru parallèlement au développement de méthodes variées d'immobilisation qui ont été mises au point et décrites au cours des récentes années - STARK ⁽⁴³⁾, SILMAN ⁽⁴⁴⁾, KAY ⁽⁴⁵⁾, ORTH ⁽⁴⁶⁾, SELEGNY, BROWN et Coll. ⁽⁴⁷⁾ ⁽⁴⁸⁾ ⁽⁴⁹⁾. Ces méthodes peuvent être regroupées en trois classes :

- l'adsorption par l'intermédiaire de liaisons secondaires, sur un support inerte ou échangeur d'ions.
- l'inclusion dans le réseau tridimensionnel d'un gel ou d'un polymère, dans une microcapsule ou un liposome, dans une fibre creuse ou pleine.
- la liaison covalente, soit directement entre un groupe chimique de l'enzyme et un groupe réactif d'un support, soit par réticulation à l'aide d'agents polyfonctionnels.

C'est le dernier volet qui a suscité la masse la plus importante de travaux. En effet bien que l'immobilisation par liaison covalente fasse appel à des techniques généralement plus élaborées que l'inclusion ou l'adsorption, cette méthode présente l'avantage de la solidité du lien enzyme-support et de l'acquisition de propriétés nouvelles surtout la stabilité et la résistance à la dénaturation.

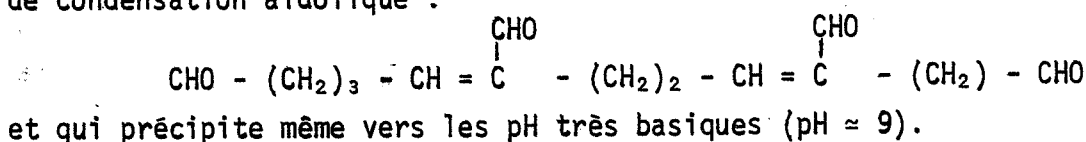
Nous avons donc utilisé une méthode d'immobilisation d'enzymes par liaison covalente à l'aide d'un réactif polyfonctionnel le glutaraldéhyde en utilisant une protéine de charge l'albumine. Cette technique présente l'avantage de permettre une fixation polyvalente de la quasi totalité des enzymes sur des supports de structure et forme variables (mousse, membranes ...). Les membranes obtenues ont des épaisseurs parfaitement contrôlables ayant une bonne résistance mécanique. En utilisant des matériaux biologiques cette membrane hydrophile permet le transport de substances biologiques et peut constituer un modèle simple d'étude des membranes dans les milieux vivants.

L'immobilisation de l'uréase ou de la cholinestérase s'obtient par dissolution dans l'albumine (humaine ou bovine) à 17,5 % et dans du Tampon phosphate (0,1M pH 7,2), ensuite le glutaraldéhyde à 12,5 % est rajouté pour assurer la coréticulation de l'albumine et de l'enzyme. Ce mélange peut ensuite être étendu sur un support solide pour former un film, le temps de réticulation pouvant varier de 5 à 30 minutes suivant la masse et les performances désirées. Il suffit ensuite de rincer et de placer la membrane dans un tampon pour éviter sa déshydratation.

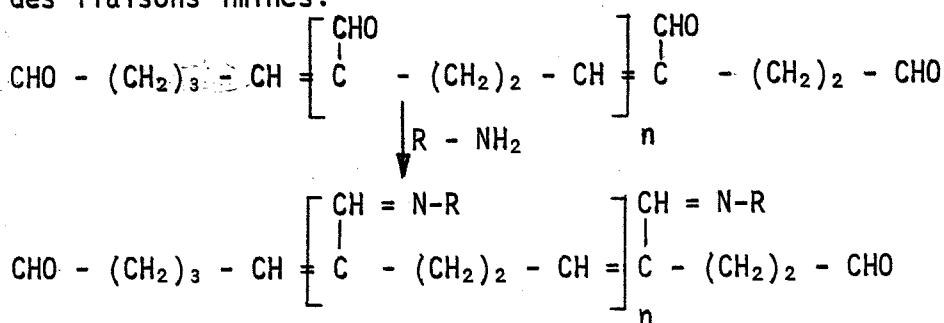
Il est possible de réticuler l'uréase sans utiliser l'albumine, cette enzyme possède une molécule suffisamment grosse pour se dispenser d'une protéine de charge. Avec la cholinestérase cela est impossible de même qu'avec des très faibles concentrations en uréase.

Il existe peu d'études sur le mécanisme d'immobilisation par covalence, et ses répercussions sur l'activité résultante de l'enzyme fixée. Une approche a été faite par MOSBACH (50) et plus récemment par MONSAN (51) sur l'immobilisation de la Trypsine par le glutaraldéhyde.

L'immobilisation par le glutaraldéhyde des protéines résulte d'une réaction avec les groupements amines des acides aminés. Comme les solutions commerciales sont à un pH très acide (voisin de pH = 3,1) pour ne pas risquer de détruire une partie de l'activité enzymatique on est obligé de tamponner les solutions de glutaraldéhyde à un pH plus neutre voire même basique. On forme alors un produit de condensation aldolique :



Il réagit avec les groupements amines primaires de l'enzyme pour donner des liaisons imines.



R pouvant représenter une protéine ou un support aminé.

La stabilité des dérivés obtenus est due au fait que la liaison imine qui s'établit est stabilisée par résonnance avec la liaison éthylénique. Aussi grâce aux fonctions réactives du polyglutaraldéhyde il est possible d'établir simultanément plusieurs liaisons entre un support amine telle qu'une protéine et une enzyme. Ceci explique l'efficacité d'immobilisation, mais également la résistance mécanique du produit obtenu.

Il est possible que ce mécanisme soit suivi d'un mécanisme secondaire, notamment en raison des facilités de cyclisation des molécules de polyglutaraldéhyde. On peut envisager que les liaisons glutaraldéhyde-protéine évoluent au cours du temps pour aboutir à des structures de plus grande stabilité. Ce qui justifierait l'évolution de l'activité de la membrane enzymatique constatée en fonction du temps de réticulation.

Au cours de l'immobilisation, l'enzyme perd souvent une partie de son activité, ceci est vrai aussi bien pour l'uréase que pour la cholinestérase. En contre partie l'une des propriétés les plus intéressantes de l'immobilisation des enzymes est l'augmentation de leur durée de vie. Ainsi pour la cholinestérase qui voit son activité altérée au bout d'une semaine en solution demeure intact après deux mois d'immobilisation.

III-2 - LES ELECTRODES ENZYMATIQUES

Les techniques spectrophotométriques, fluorimétriques, colorimétriques, de polarisation rotatoire sont couramment utilisées en enzymologie. Dans notre cas précis, elles ne sont pas adaptées pour traduire le microenvironnement de la membrane enzymatique. Nous avons plutôt cherché un détecteur faisant corps intimement avec la membrane biologique et capable de transformer rapidement en signaux électriques les divers changements d'état de cette membrane. Les électrodes spécifiques semblent être les mieux adaptées à cette étude ; en outre, revêtues d'une membrane enzymatique elles peuvent donner lieu à des applications analytiques intéressantes que nous allons développer par la suite.

L'activité enzymatique peut être suivie par mesure de la concentration soit du substrat, soit du produit de la réaction. L'acétylcholinestérase décomposant l'acétylcholine en choline et en acide acétique, l'utilisation d'une électrode à pH en contact avec la membrane enzymatique permet de suivre l'évolution de la réaction. Quant à la décomposition de l'urée par l'uréase, nous avons le choix entre une électrode à pNH_4^+ ou à pCO_2 pour évaluer la cinétique de la réaction.

III-2-1 - ELECTRODE A UREASE

Des études comparatives entre l'électrode à pNH_4^+ et pCO_2 (52) ont montré que ces deux électrodes sont capables de travailler dans le même domaine de concentration en substrat avec la même sensibilité. L'emploi d'une électrode à pCO_2 a présenté l'avantage d'une grande sélectivité grâce à l'hydrophobie de sa membrane silicone perméable uniquement aux gaz et d'éliminer ainsi l'interférence des autres cations présents dans la solution.

La fixation de l'uréase sur l'électrode à pCO_2 s'obtient en dissolvant de 0,1 g à 1 g d'uréase SIGMA à 3300 UI/g dans 500 μl de Tampon phosphate 0,1M pH = 7. On ajoute ensuite 500 μl d'albumine humaine dans le cas des faibles concentrations en enzyme. Ce mélange bien homogénéisé forme la solution enzymatique. 2 μl de cette solution sont déposés à l'aide d'une micropipette sur la membrane silicone auxquels est ajouté 3 μl de glutaraldéhyde à 12,5 % tamponné à pH 8. Le temps de réticulation est généralement de 10 minutes, mais nous verrons qu'il peut varier entre 3 minutes et 1 heure, de même que la concentration en enzyme au niveau de la membrane selon les fonctions que l'on attend de l'électrode. On forme une membrane homogène parfaitement adhérente à la tête de l'électrode d'une épaisseur de 0,025 mm.

Après réticulation la membrane est rincée à l'eau distillée pour éliminer l'excès de glutaraldéhyde puis la tête active de l'électrode enzymatique est plongée dans une solution tampon pH 7 pour sa conservation.

III-2-2 - ELECTRODE A CHOLINESTERASE

Une des manières la plus simple de connaître l'activité de l'acétylcholine immobilisée est de greffer cette enzyme au niveau de la tête d'une électrode à pH.

En présence du substrat, les ions H^+ issus de la réaction seront ainsi détectés par l'élément de verre sensible. L'expérience acquise avec l'électrode à uréase nous a permis de maintenir sur la tête de verre une membrane très fine à l'intérieur de laquelle l'enzyme est fixée selon la technique opératoire précédente.

Une électrode de verre Radiometer dont la tête présente une surface plane a été utilisée pour permettre un contrôle aisé de l'épaisseur et faciliter la préparation. L'électrode de référence est une électrode au calomel.

III-3 - LES METHODES NUCLEAIRES

L'utilisation des traceurs radioactifs est un moyen commode et non destructif de mettre en évidence d'une façon certaine la présence d'un élément donné dans un composé. Si on néglige d'une part les effets isotopiques et d'autre part l'effet des radiations ionisantes du traceur sur le système étudié on peut admettre que son comportement chimique et physique est analogue à son isotope stable. Ces approximations admises il conviendra de se placer dans des conditions limitant au maximum les effets nocifs dus aux radiations, ou tout ou moins d'en contrôler les conséquences. Le comptage des rayonnements γ est sans conteste le plus aisé car les phénomènes d'absorption sont limités, d'autre part, l'absence de particule chargée est préférable pour éviter les dégâts en milieu biologique. Aussi, la désintégration par capture électronique est l'idéale. Malgré la panoplie des isotopes radioactifs le choix est relativement limité pour satisfaire les conditions expérimentales. Si dans certains cas l'utilisation de radioéléments émetteurs γ a été possible, le marquage des molécules organiques nous a imposé l'emploi d'émetteur β pur, de sorte que plusieurs techniques de détection ont dû être mises en oeuvre.

III-3-1 - EMETTEURS γ

Pour les trois ions métalliques étudiés :

le cobalt, le mercure, l'argent, il est possible de fabriquer des éléments artificiels émetteurs γ .

III-3-1-1 - Choix des isotopes :

- le cobalt offre trois isotopes :

- cobalt 60 : produit par une réaction n, γ sur le cobalt 59, il se désintègre par émission β^- ;
- cobalt 58 : produit à l'aide de neutrons rapides par réaction np , c'est un émetteur β^+ ;
- cobalt 57 : produit au cyclotron par les réactions suivantes $(Fe + d)$, $(Fe + p)$, $(Ni + p)n$ il se désintègre suivant une capture électronique à 100 %.

- l'argent

- argent 110 m : produit d'une réaction par les deutons sur du $^{110}_{46}Pb$, il se désintègre par émission β^- et transition interne ;
- argent 111 est un produit de fission (f, dn) , il se désintègre par émission β^-

- le mercure

- mercure 197 : produit en réacteur par réaction aux neutrons thermiques sur l'isotope 196 stable du mercure, il se désintègre par capture électronique et conversion interne.
- mercure 203 : produit par réaction aux neutrons thermiques sur l'isotope 202 stable du mercure, il se désintègre par émission β^- .

Les schémas de désintégration de ces isotopes sont donnés par la figure (1). Compte tenu de l'appareillage, et du temps des expériences nous avons sélectionné les radioéléments ayant une période suffisamment longue pour permettre une étude sur plusieurs jours. Aussi nous avons retenu :

Isotope	Mode de désintégration	Période	pic γ principal en MeV
	Capteur électronique		
$^{57}_{27}Co$	β^- et T.I.	267 j	0,122
$^{110m}_{47}Ag$	β^-	253 j	0,66
$^{203}_{80}Hg$	β^-	47 j	0,279

Les produits nous ont été fournis par le C.E.A.

^{57}Co sous forme chlorure d'activité spécifique $30.12\mu Ci.g^{-1}$

^{110m}Ag sous forme nitrate d'activité spécifique $1Ci.g^{-1}$

^{203}Hg chlorure mercurique " " 1.8mCi/mg

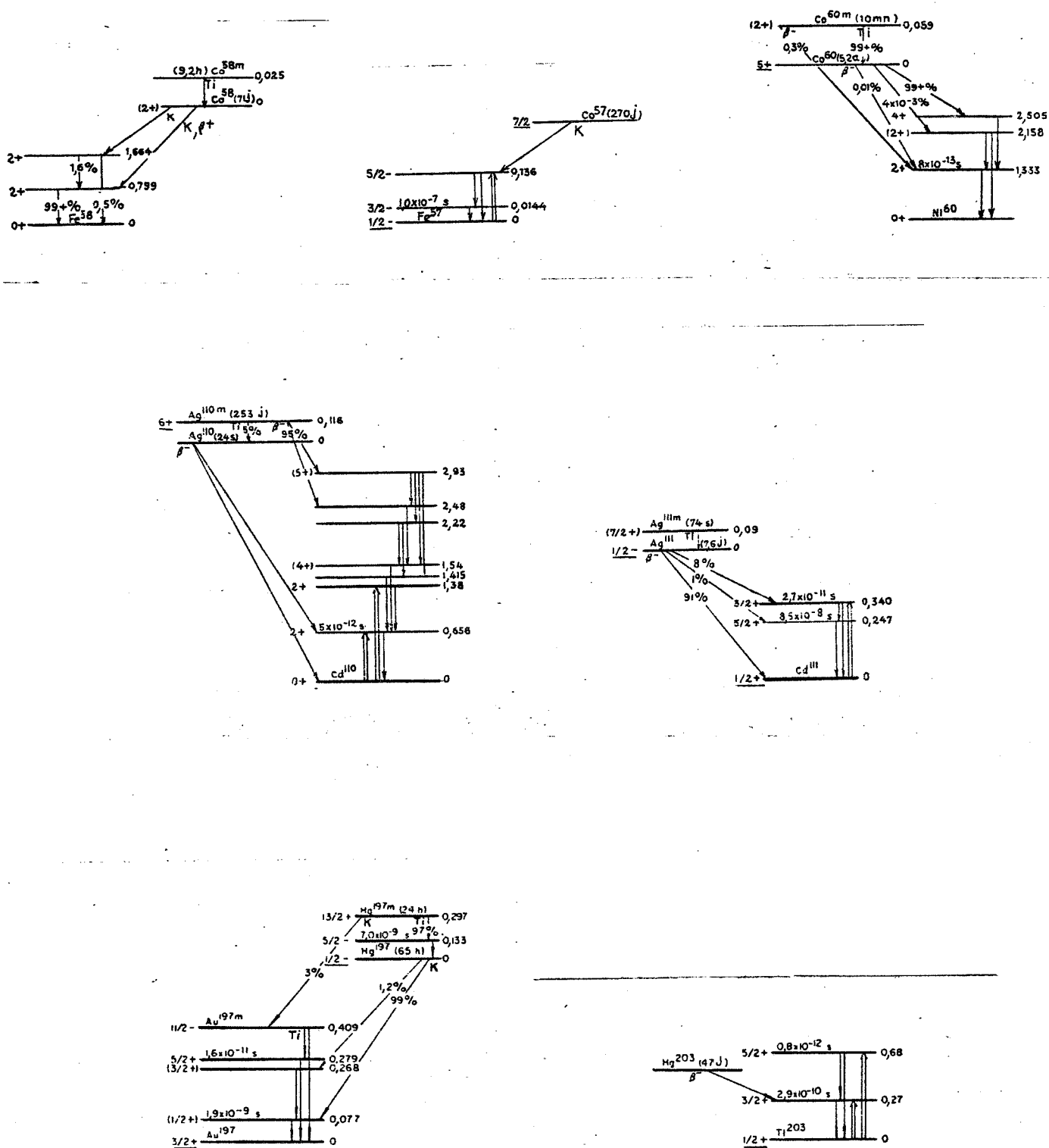


Figure 1 - Schémas de désintégration des divers isotopes pouvant être utilisés.

III-3-1-2 - Appareillage

Afin de respecter les meilleures conditions de géométrie nous avons utilisé des détecteurs à cristal puits de NaI activé au Tl ayant une efficacité plus grande que les scintillateurs à cristal massif et sont mieux adaptés à la mesure d'échantillon de faible activité et de faible énergie.

Nous disposons de deux détecteurs :

- Un compteur automatique SAIP pour la mesure des grandes séries où les échantillons sont placés dans des tubes en plastique répartis sur deux couronnes concentriques. La sonde centrale est équipée d'un cristal puits de 76 x 76 mm (3" x 3") dont la résolution mesurée pour la raie γ du ^{137}Cs est de 9,5 %. Elle est reliée à un spectromètre du type SPINT à 2 canaux et une échelle de comptage à deux voies autonomes.

- Pour le comptage d'échantillon unitaire nous avons utilisé un petit détecteur puits PICKER équipé d'un cristal NaI - Tl de 2" x 2" indépendant de l'appareillage automatique, d'accès manuel. Ce puits permet le contrôle de la radioactivité déposée sur la membrane enzymatique de l'électrode. Des tubes de plastique servant d'entretoise entre l'électrode et les parois du puits maintiennent l'électrode verticale dans une géométrie rigoureuse. Un tube fermé à son extrémité dans lequel se glisse exactement l'électrode sert de contenant à une solution liquide, et évite la contamination (figure 2).

Le puits est relié à une chaîne PICKER sensiblement identique à la précédente et pouvant être couplée à un enregistreur.

III-3-1-3 - Spectrométrie

Les spectres γ des trois isotopes sont donnés dans la figure 3. Pour chacun d'eux la fenêtre du sélecteur est réglée sur le pic d'absorption principal pour une haute tension = 1080 V. Ainsi pour le pic du cobalt 57 la résolution est de 27 % et le rendement de comptage déterminé avec une source étalon est de 91 %. Ce rendement est excellent pour de telles énergies et diminue avec des radioéléments plus énergétiques tels que le ^{60}Co $E_{\gamma} = 1332 \text{ KeV}$, il n'est plus que de 25 %.

Dans le cas d'un mélange de radioéléments l'examen des spectres montre que pour déterminer la radioactivité individuelle d'un élément il est nécessaire d'évaluer au préalable le taux de radioactivité imputable aux autres dans sa fenêtre de comptage. L'argent 110 est l'élément le plus énergétique et son pic

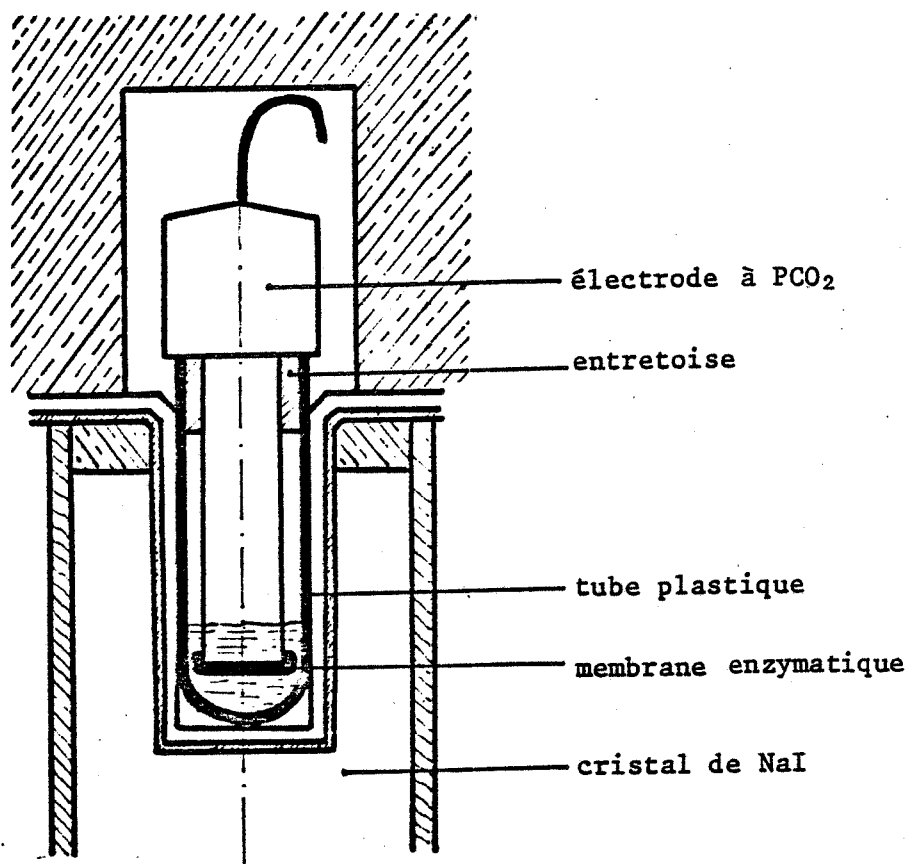


Figure 2 - Géométrie de comptage γ d'une électrode enzymatique

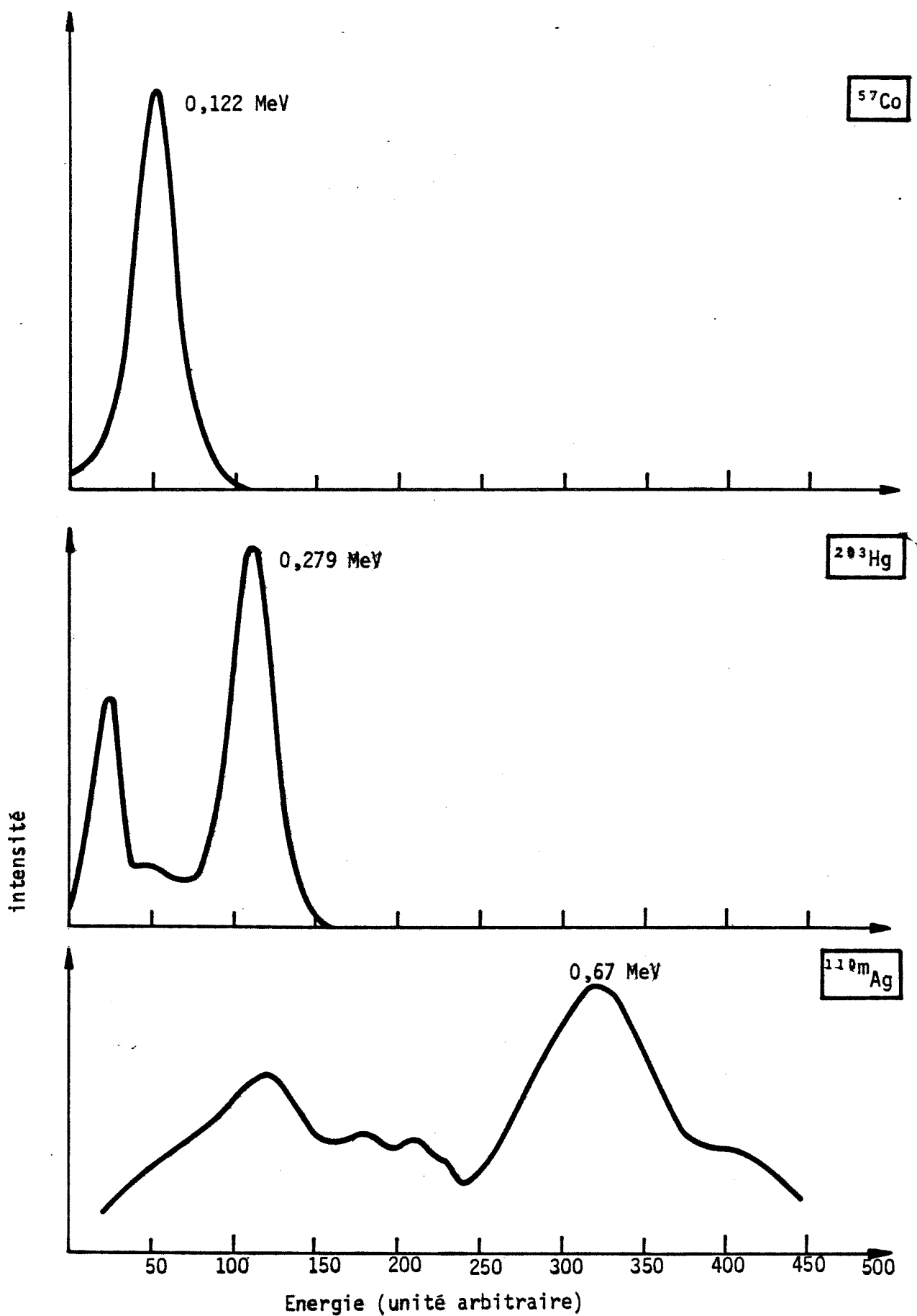


Figure 3 - Spectrogrammes des radioéléments ^{57}Co ^{203}Hg $^{110\text{m}}\text{Ag}$

de 0,66 MeV est bien séparé du spectre des autres traceurs. Par contre, il est la cause d'un bruit important pour le comptage du cobalt et du mercure. De même une partie de la radioactivité du mercure 203 est comptée dans la fenêtre du cobalt. Un étalonnage individuel est nécessaire à partir d'une source séparée. Pour chaque radioélément on fait le comptage sur son pic d'absorption maximum, puis le comptage de sa radioactivité avec les réglages correspondant aux pics d'absorption de chacun des autres isotopes du mélange.

Si N_A est le nombre d'impulsions comptées sur le pic d'absorption de l'élément A

Si N_{BA} est le nombre d'impulsions comptées dans la fenêtre de B dû à la radioactivité de A, on définit le rapport :

$$R_{BA} = \frac{N_{BA}}{N_A} : \text{taux de participation de A dans B.}$$

Pour les 3 isotopes on a le tableau :

	participation de : ^{110}Ag	participation de : ^{203}Hg	participation de : ^{57}Co
pic de : ^{110m}Ag		$R_{(\text{Ag-Hg})} = 0$	$R_{(\text{Ag-Co})} = 0$
pic de : ^{203}Hg	$R_{(\text{Hg-Ag})} = 0,45$		$R_{(\text{Hg-Co})} = 0$
pic de : ^{57}Co	$R_{(\text{Co-Ag})} = 0,43$	$R_{(\text{Co-Hg})} = 0,49$	

Pour déterminer la radioactivité propre d'un élément dans un échantillon contenant le mélange il faut donc enregistrer les comptages simultanément sur 3 voies. La mesure de la radioactivité de l'argent est déterminée immédiatement. Au moyen des rapports précédents on déduit sa participation dans le pic du mercure qui permet ensuite de calculer l'activité du cobalt.

III-3-2 - EMETTEURS β

Les molécules organiques ne peuvent être marquées qu'à l'aide des éléments qui les composent. Dans la plupart des cas ceux-ci sont limités à l'oxygène, l'azote, le carbone et l'hydrogène. Les deux premiers ont des isotopes radioactifs de période trop courte (72 s pour l'oxygène 14) de sorte que le marquage est réalisé à l'aide des deux derniers en utilisant le carbone-14 (^{14}C) ou le tritium (^3H). Ces deux

isotopes sont des émetteurs β^- purs dont les énergies sont trop faibles pour être détectées dans des conditions satisfaisantes avec les détecteurs solides précédents. L'emploi de détecteur à scintillation liquide est nécessaire.

III-3-2-1 - Etude de diffusion des substrats : Mesure en scintillation liquide

Afin d'étudier les phénomènes de diffusion des substrats à travers la membrane biologique nous avons utilisé l'acétylcholine marquée au tritium, l'urée marquée au carbone 14, ces produits nous ayant été fournis par le laboratoire AMERSHAM avec une activité spécifique successivement de 150 mCi/mole et de 60 mCi/mole.

- dispositif expérimental

Le flux de diffusion à travers une membrane non active obéit à la première loi de Fick :

$$J = - D \frac{\partial C}{\partial x}$$

avec D coefficient de diffusion en $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

J flux en $\text{mole} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

Une cellule de diffusion a été réalisée en "altuglass" où la membrane sépare deux compartiments contenant les solutions métaboliques. La membrane utilisée peut être de l'albumine réticulée pour la mesure de diffusion pure ou enzymatique dans le cas d'une étude de diffusion réaction, son épaisseur est de 0,08 mm et la surface de diffusion de 0,785 cm^2 . Les deux compartiments ont un volume de 11 ml chacun et ils sont prévus pour recevoir divers capteurs de mesure et de régulation (figure 4). L'isothermie de l'ensemble de la cellule est obtenue par un thermostat à circulation réglée sur 25°C. L'agitation magnétique des solutions de chacun des compartiments permet de réduire l'épaisseur des couches-limites, et facilite la mesure des coefficients de diffusion des différents substrats.

- mesure de diffusion

En régime quasi stationnaire les coefficients de diffusion apparents sont donc tirés de la loi de FICK :

$$J = D \frac{\Delta C}{e} \quad (2)$$

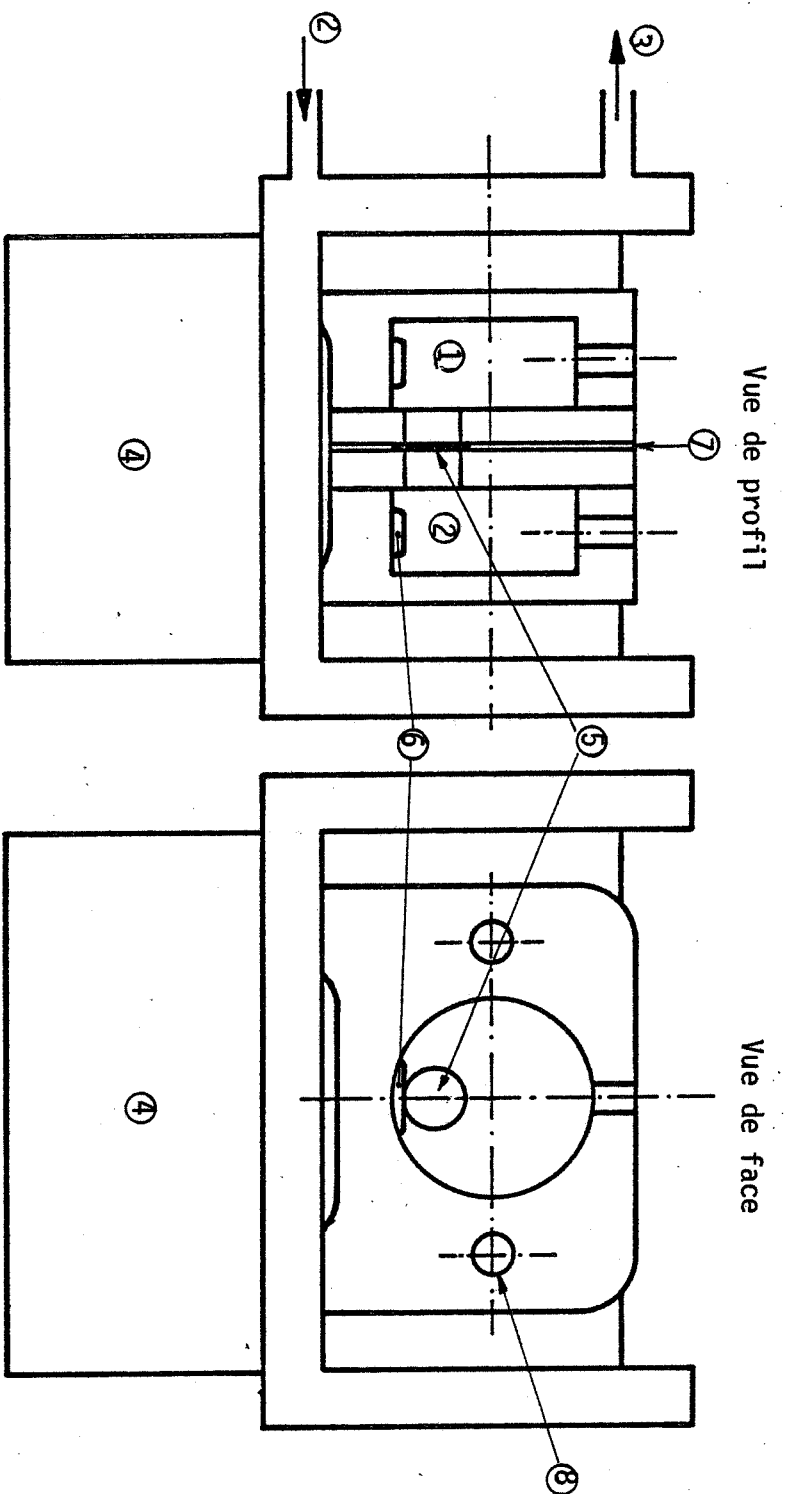


Figure 4 - Schéma de la cellule utilisée pour déterminer les coefficients de diffusion des métabolites à travers une membrane.

- | | | | | | | | |
|---|---------------|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------|---------|
| ① | ② | ③ | ④ | ⑤ | ⑥ | ⑦ | ⑧ |
| | Compartiments | Thermorégulation | Agitation magnétique | Membrane enzymatique | Barreaux d'agitation | Joints | Serrage |

J : flux instantané

Δc : différence de concentration des deux solutions séparées par la membrane

e : épaisseur de la membrane

D : coefficient effectif expérimental.

Avant l'expérience la membrane et les deux compartiments sont équilibrés avec une solution tampon sans substrat (dans le cas des substrats avec une solution tampon phosphate pH = 7,4 pendant 24 h). On injecte dans l'un des compartiments 100 μ l de substrat N contenant 0,02 mCi de solution traceuse, en même temps dans le second compartiment on injecte 100 μ l de solution tampon pour rétablir l'équilibre, le tout à la température de 25°C. Périodiquement, à l'aide d'une micropipette 5 μ l sont prélevés de la solution du compartiment 2 et placés dans une fiole à scintillation en verre auquel y est ajouté 10 ml de liquide scintillant. La mesure de la radioactivité du ^{14}C est faite en utilisant de "l'Insta-Gel" (produit PACKARD) comme scintillateur, celle du tritium marquant l'acétylcholine avec le mélange de BRAY ;

PPO	4 g	Méthanol	100 ml
POPOP	0,2 g	Ethylène glycol.	20 ml
Naphtalène	60 g	Dioxane	800 ml

Ces deux produits n'étant pas à base de toluène permettent de solubiliser la solution aqueuse à compter.

Le compteur utilisé est un spectromètre PACKARD TRI-CARB modèle 3255 à 3 voies de mesures indépendantes, possédant un passeur d'échantillons automatiques avec enceinte réfrigérée. La source étalon externe est du ^{226}Ra .

A la fin de l'expérience les échantillons contenant les prélèvements et le scintillateur sont placés dans l'enceinte réfrigérée à l'abri de la lumière. Vingt quatre heures d'attente sont nécessaires avant de démarrer le comptage de la radioactivité et plusieurs cycles de passage permettent de s'assurer que tous les phénomènes de chimiluminescence ont bien totalement disparus. Les corrections de quenching peuvent être faites simultanément en utilisant le rapport de standardisation externe ou pour plus de sûreté en utilisant la méthode de l'étalon interne, mais cette méthode a le désavantage d'être laborieuse et entraîne la perte des échantillons d'origine.

Les échantillons comptés ont une faible radioactivité. On admet (53) un comptage minimal significatif égal à :

$$R_{\min} = 10 \sqrt{M.P}$$

R_{\min} : comptage en impulsions par minute

MP : mouvement propre exprimé en impulsions par minute.

La mesure de la radioactivité de ces échantillons doit être faite avec un réglage fournissant un mouvement propre minimum. Ce réglage est obtenu en réduisant la largeur du canal de mesure. Cette diminution entraîne aussi une diminution de l'efficacité de comptage. On cherche un compromis en déterminant un facteur de mérite maximum ou facteur de qualité représenté par :

$$f = \frac{E^2}{MP}$$

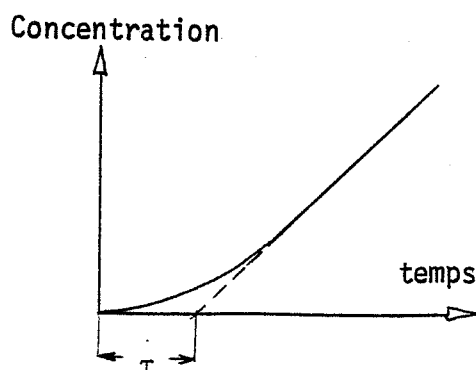
E = comptage de l'échantillon en impulsions par minute.

La recherche de f maximum est obtenue en déplaçant la position du seuil inférieur du spectromètre. Pour chaque valeur de réglage de canal on mesure le mouvement propre et la radioactivité d'un échantillon.

Les résultats obtenus en dpm (désintégration par minute) sont transcrits en moles. La courbe représentant les concentrations de substrat ayant diffusé en fonction du temps permet par sa pente de déterminer le flux en régime quasi stationnaire et donc d'accéder au coefficient de diffusion apparent selon l'équation (2). L'intersection de la pente avec l'axe des abscisses définit le "Time lag".

$$\tau = \frac{e^2}{6D}$$

et permet une évaluation rapide du coefficient de diffusion. On trouve ainsi pour l'acétylcholine diffusant à travers une membrane d'albumine réticulée avec le glutaraldéhyde un coefficient de diffusion \bar{D} égal à $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.



III-3-2-2 - Détection des organophosphores marqués au ^{32}P par effet Cerenkov

Les composés organophosphorés peuvent être marqués soit avec le ^{14}C ou le ^3H sur un groupement éthyl, soit avec l'atome de phosphore en utilisant l'isotope ^{32}P . Ces trois radionuclides sont des émetteurs β^- purs et les meilleurs rendements de détection pour les faibles activités sont obtenus à l'aide de détecteur à scintillation liquide.

Avec le ^{14}C ($E_{\text{max}} = 155 \text{ keV}$) et le ^3H ($E_{\text{max}} = 18 \text{ keV}$) les échantillons membranaires doivent être dissous dans le scintillateur liquide si l'on veut mesurer la radioactivité car ces particules faiblement énergétiques seraient complètement absorbées par la matière. Le ^{32}P a une émission β plus énergétique ($E_{\text{max}} = 1710 \text{ keV}$) et permet l'étude en phase hétérogène. Les réactifs scintillants habituellement utilisés pour la mesure de la radioactivité β nécessitent des solvants organiques qui détruisent la membrane protéique, ce qui exclut dans tous les cas la possibilité de récupérer l'échantillon intact et de continuer l'étude pour corrélérer avec l'activité enzymatique.

Nous avons alors utilisé "l'effet Cerenkov" produit par l'émission des particules β du ^{32}P dans l'eau pour mesurer la radioactivité de la membrane enzymatique inhibée par le paraoxon ^{32}P . Bien que le rendement de détection soit moindre qu'en scintillation liquide classique, cette méthode a l'avantage de ne pas détruire l'échantillon et de conserver la membrane enzymatique dans son milieu tampon pour la mesure. De plus l'absence de réactif scintillant supprime la chimiluminescence et permet des mesures presque instantanées qui facilitent l'étude cinétique.

L'emploi d'un tel radionuclide présente par contre un inconvénient : les risques de radiolyse et de dégâts du matériau biologique sont accrus avec l'émission de particules chargées très énergétiques. Aussi, avant d'appliquer cette méthode nous avons vérifié l'effet possible de la désintégration du ^{32}P sur la membrane enzymatique.

Des électrodes d'AChE ont été immergées dans 5 ml de solution de tampon phosphate de sodium pH 7,4 marquées au ^{32}P . La mesure de l'activité enzymatique en fonction du temps de séjour dans une solution de 0,4 mCi/ml (fig. 5) ainsi que celle en fonction de la radioactivité croissant jusqu'à 5 mCi (Fig. 6) ne montre aucune baisse sensible. Ces résultats confirment ceux de KAWASHIMA et DALE (54) (55) (56) qui trouvèrent une radiorésistance considérable des enzymes fixées.

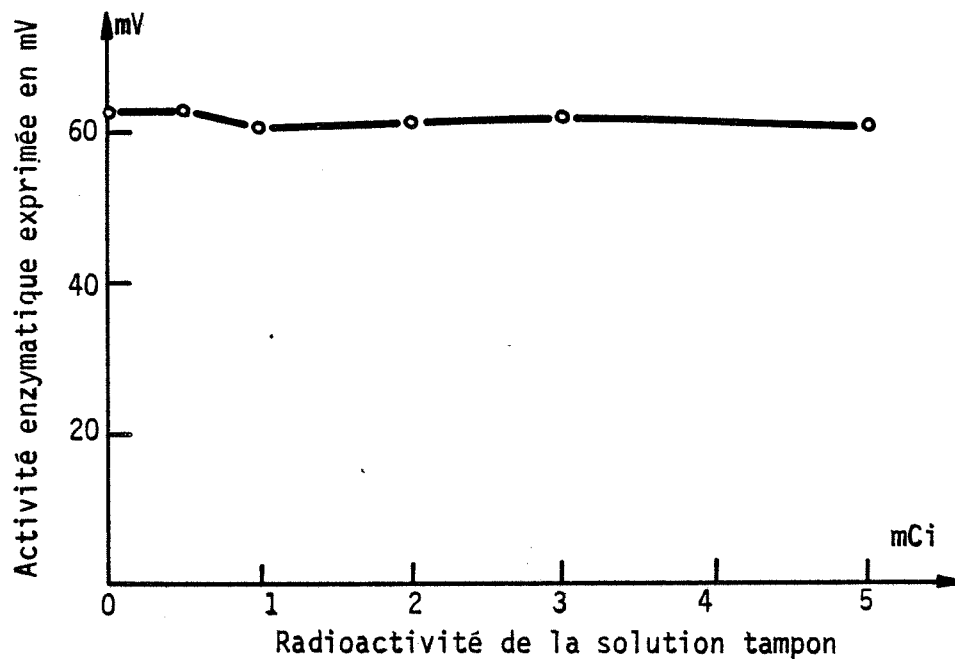


Figure 6 - Contrôle de la réponse vis-à-vis de l'acétylcholine $10^{-2}M$ d'une électrode à AChE ayant été soumise pendant un jour à des solutions phosphate - ^{32}P de radioactivité variant de 1 à 5 mCi.

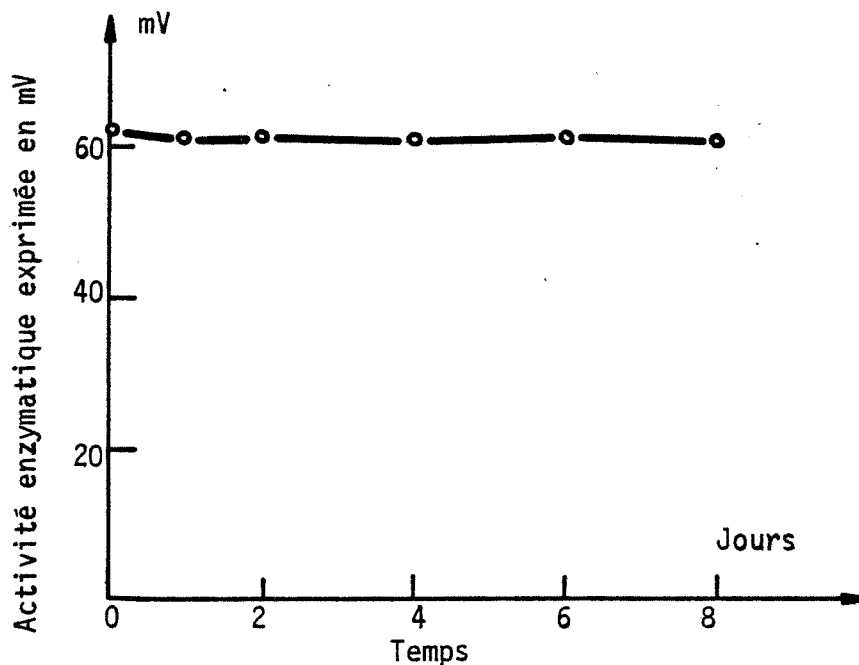


Figure 5 - Réponse d'une électrode à AChE vis-à-vis de l'acétylcholine $10^{-2}M$ en fonction du temps de séjour dans des solutions tampon phosphate ^{32}P pH = 7,4 de 2 mCi (activité spécifique 0,4 mCi/ml).

L'utilisation du ^{32}P pour le marquage du paraoxon peut être utilisée pour notre étude sans qu'il y ait perturbation de l'activité enzymatique due à la radioactivité, d'autant plus que les radioactivités utilisées dans les expériences qui suivent seront nettement plus faibles que celles appliquées pour le test précédent.

La radiolyse possible du produit radioactif est contrôlée en cours d'expérience en comparant l'action inhibitrice de l'organophosphore marqué et la concentration en produit "froid" à l'aide d'une électrode enzymatique sensible.

RAPPEL :

Des particules chargées qui traversent un milieu transparent avec une vitesse plus grande que la vitesse de propagation de la lumière produisent dans le milieu une onde électromagnétique de choc avec un angle θ par rapport à la direction de la particule Bêta. Cette émission de lumière Cerenkov peut être détectée en utilisant les appareils de comptage à scintillation liquide de technologie récente.

La condition de formation de la radiation Cerenkov peut être écrite sous la forme :

$$\cos \theta = \frac{1}{\beta n} \quad \text{avec} \quad \beta = \frac{v}{c}$$

v = vitesse de la particule chargée dans le milieu transparent

c = vitesse de la lumière dans le vide

n = indice de réfraction du milieu transparent

$\beta > 1/n$ est une condition nécessaire à l'émission Cerenkov.

Le calcul montre que dans le cas d'un milieu transparent tel que l'eau il se forme une radiation Cerenkov seulement avec des particules β dont l'énergie est supérieure à 265 keV. Le spectre continu du ^{32}P est donc amputé et la détection par effet Cerenkov ne sera possible que pour les particules d'énergie comprise entre 265 keV et 1710 keV. Sans tenir compte de l'absorption du rayonnement, on voit donc que le rendement de détection est affaibli.

MATERIEL ET DISPOSITIF EXPERIMENTAL :

L'appareil est celui utilisé en scintillation liquide classique. La figure 7 montre la spectrométrie du ^{32}P obtenue avec la technique Cerenkov. Un spectre du ^3H dans 10 ml d'Insta-Gel (PACKARD) est tracé en comparaison pour la même valeur du Gain. Les spectres d'émission des scintillateurs utilisés en scintillation liquide sont accordés à la sensibilité spectrale des photomultiplicateurs utilisés. La lumière Cerenkov est émise dans le domaine des longueurs d'ondes correspondant au proche ultraviolet. A ces longueurs d'ondes, une absorption optique importante a lieu dans les parois du flacon et dans la fenêtre des photomultiplicateurs. L'efficacité de détection obtenue avec la technique Cerenkov de l'ordre de 35 % est inférieure à celle obtenue en scintillation liquide.

L'émission Cerenkov est spatialement orientée avec un angle fonction de l'énergie alors que la lumière émise en scintillation liquide est isotropique. L'efficacité de comptage dépend du volume de l'échantillon. La figure 8 montre les résultats obtenus exprimés en % par rapport à l'échantillon ayant le taux de comptage maximum en faisant varier le volume de l'échantillon.

Pour réduire les conséquences de la nature directionnelle de la lumière Cerenkov certains auteurs préconisent de déconnecter le circuit de coïncidence des deux photomultiplicateurs ⁽⁵⁷⁾. Mais si nous avons une amélioration notable de l'efficacité de détection, le taux de comptage du bruit de fond est également augmenté et la reproductibilité des résultats n'est pas fiable.

On peut améliorer l'efficacité par addition au milieu de comptage de SHIFTERS ⁽⁵⁸⁾ ⁽⁵⁹⁾ qui permettent un déplacement du spectre d'émission vers des longueurs d'ondes plus grandes. L'introduction de ces substances organiques revient à poser le problème de la scintillation liquide classique qui modifie le milieu de la membrane enzymatique.

Parmi les avantages de la technique de comptage Cerenkov il faut souligner le bruit du fond inférieur à celui obtenu avec un scintillateur liquide. Ainsi avec la fenêtre réglée pour le ^{32}P en mesure Cerenkov qui coïncide pratiquement à celle du tritium dans le Bray on peut comparer les valeurs du bruit de fond.

	BF en cpm
en effet Cerenkov 10 ml d'eau	28
Bray 10 ml	69

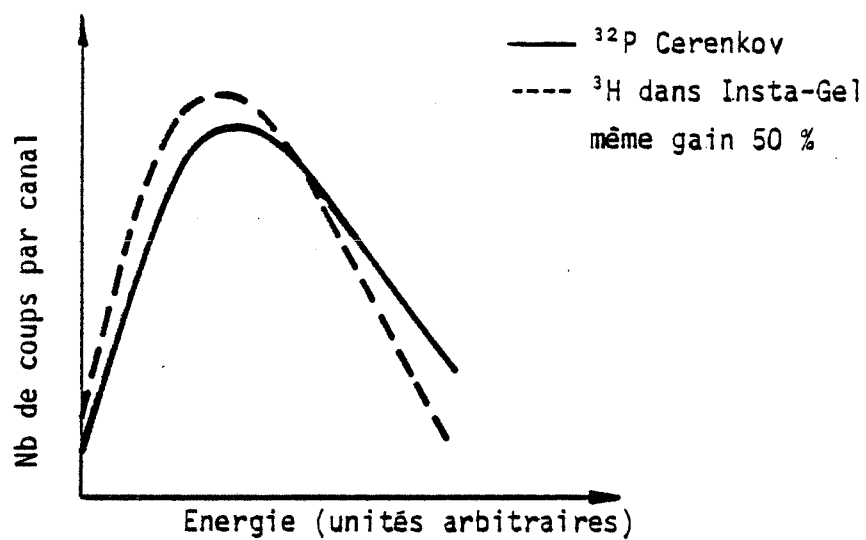


Figure 7 - Comparaison de la spectrométrie du ^{32}P par effet Cerenkov dans 10 ml d'eau et du ^3H dans un scintillateur liquide (10 ml d'Instagel)

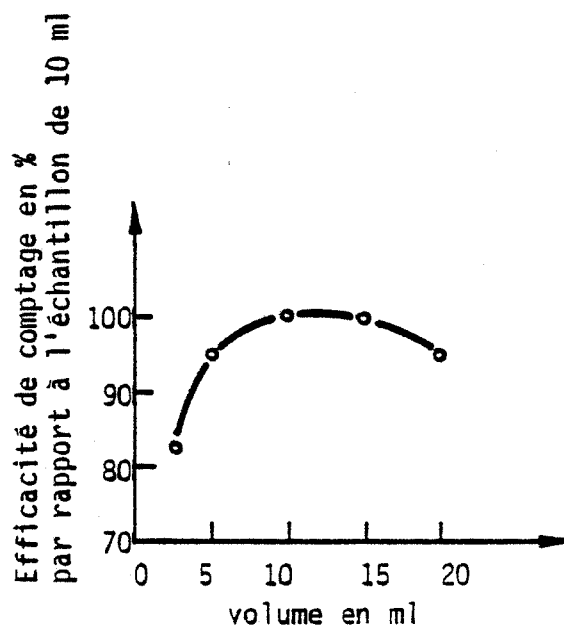


Figure 8 - Efficacité du comptage Cerenkov du ^{32}P en fonction du volume

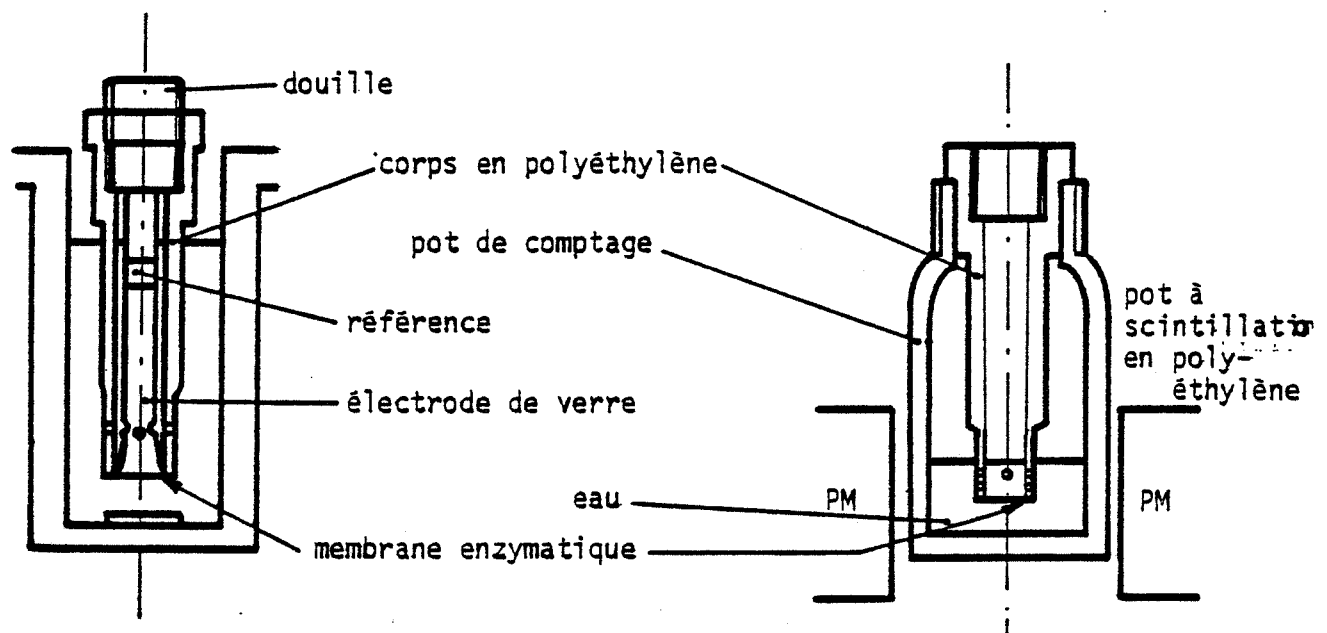
On constate une réduction approximative d'un facteur 2,5. Ceci provient du fait que le rayonnement ambiant ne donne pas de particules chargées d'énergie suffisantes pour créer un effet Cerenkov. Le mouvement propre s'en trouve diminué d'autant. Ceci est d'un grand intérêt puisque c'est de lui que dépend la sensibilité de la mesure.

Les mesures ont été faites dans des fioles en polyéthylène de 25 ml. Outre l'intérêt financier et pratique (usage unique), l'efficacité de comptage est supérieure à celle obtenue dans le verre, ceci provenant sans doute d'une meilleure transmission optique du rayonnement ultraviolet et de l'effet dispersif du plastique sur la nature directionnelle de la lumière Cerenkov. De plus, les fioles de plastique donnent un bruit de fond nettement inférieur 28 cpm contre 100 cpm avec une fiole de verre, ce rayonnement parasite provenant de l'effet du ^{40}K ($E = 1.3 \text{ MeV}$).

La mesure de la radioactivité des membranes enzymatiques peut être réalisée en immergeant les membranes dans un pot à scintillation contenant 10 ml d'eau. Dans le cas où l'on a besoin de connaître aussi l'activité enzymatique, les membranes doivent être fixées sur l'électrode de verre. Or l'immersion directe de l'électrode de verre dans la fiole à scintillation est impossible à cause de la taille, mais aussi de l'absorption et de la rétrodiffusion importante du rayonnement provoqué par le support de verre. Nous avons donc modifié le corps de l'électrode d'AChE afin de pouvoir à volonté mesurer la radioactivité de la membrane sans phénomène perturbateur important et l'activité enzymatique sans risque de détruire la membrane. Ce dispositif devant nous permettre de corréler les mesures d'activité enzymatique avec la quantité d'inhibiteur.

La figure 9 schématise le dispositif : un tube en polyéthylène très mince transparent sert de support à la membrane enzymatique à l'extrémité duquel elle est fixée. Il sert de corps à l'électrode de verre qui s'ajuste à l'intérieur, et dont la surface active plate est pressée contre la paroi interne de la membrane enzymatique au moyen d'une douille filetée se vissant sur le corps en plastique. Des trous sont percés dans la paroi pour assurer le libre passage du liquide.

Ce dispositif permet de séparer facilement la membrane d'AChE de l'électrode de verre. Le comptage se fait donc en introduisant dans une fiole à scintillation contenant 10 ml d'eau le tube de plastique portant la membrane en l'absence



Montage de l'électrode de verre
dans le tube porte membrane
pour la mesure de l'activité
enzymatique

Tube porte membrane en
position de comptage par
effet Cerenkov

Figure 9 - Dispositif permettant la mesure simultanée de l'activité enzymatique des membranes de cholinestérase et de la radioactivité du paraoxon marqué au ^{32}P par effet Cerenkov.

de l'électrode de verre. Le diamètre extérieur du tube est ajusté au diamètre intérieur des fioles. Un épaulement du tube repose sur l'ouverture du goulot et positionne en hauteur la membrane radioactive au milieu du liquide. Ainsi une géométrie rigoureuse du comptage est toujours respectée et permet une détection proche des 4π stéradians.

ETALONNAGE - COEFFICIENT D'EFFICACITE - QUENCHING

Dans les mesures par effet Cerenkov il n'y a pas de quenching chimique, seul le quenching couleur peut avoir lieu. L'absence de chimiluminescence permet la mesure presque instantanée. Il suffit d'attendre 2 mn que l'échantillon soit à la température régulée de l'enceinte.

Pour corriger les effets dûs au quenching couleur, on utilise les mêmes méthodes qu'en scintillation liquide :

- la méthode de l'étalon interne
- la méthode du rapport des canaux
- la méthode du rapport de standardisation externe, à condition que la source γ externe puisse produire des électrons Compton d'énergie suffisante pour provoquer l'effet Cerenkov. Cela est possible avec ^{226}Ra mais pas avec ^{137}Cs ou le ^{133}Ba .

Dans le cas où les échantillons ne sont pas solubilisés, ces méthodes de correction ne peuvent être utilisées pour déterminer les efficacités de comptage car les mesures sont perturbées par les phénomènes d'autoabsorption des particules β^- régis par l'équation :

$$I_c = \frac{I_{oc}}{\mu \cdot x} (1 - e^{-\mu x})$$

avec

- I_c : nombre de particules comptées
- I_{oc} : nombre de particules comptées s'il n'y avait pas d'absorption
- x : épaisseur de la membrane
- μ : coefficient d'absorption

Nous avons eu recours à une méthode indirecte d'étalonnage en utilisant le pouvoir de régénération de l'iodure de méthyl-pyridine aldoxime (PAM) sur la membrane d'ACHé inhibée par la paraoxon. Comme nous le verrons plus loin cette substance par son pouvoir nucléophile attaque l'enzyme inhibée et fait passer

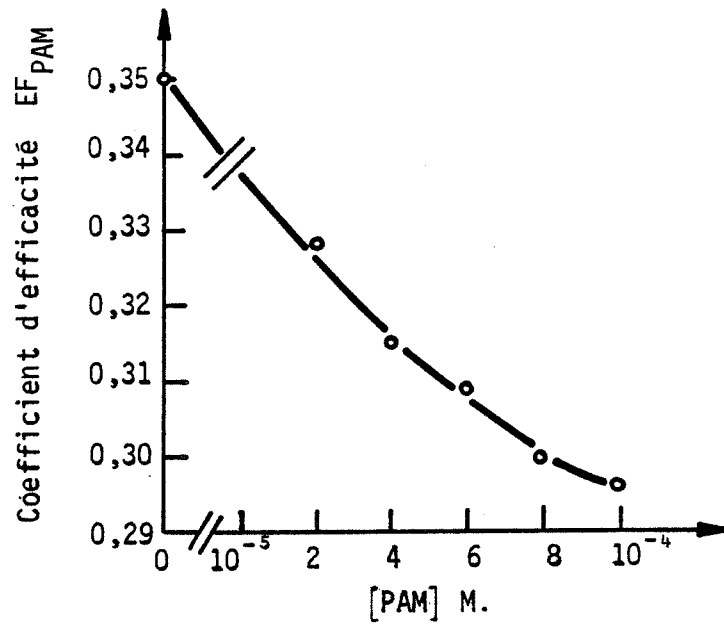


Figure 11 - Courbe de correction de quenching couleur dans la PAM. Evolution du facteur d'efficacité de comptage du ^{32}P par effet Cerenkov en solution en fonction de la concentration des solutions aqueuses de PAM par la méthode de l'étalon interne.

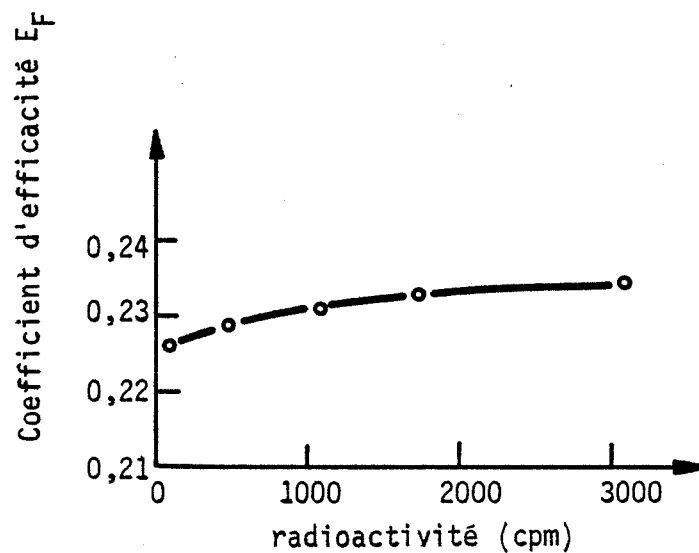


Figure 10 - Coefficient d'efficacité du comptage des électrodes enzymatiques en fonction de la radioactivité déposée sur la membrane.

une partie de l'organophosphore en solution. En comptant la perte de radioactivité de l'électrode, et la radioactivité de la solution de PAM on peut évaluer le facteur F_a dû à la perte de comptage par autoabsorption.

$$F_a = \frac{(\text{Comptage électrode inhibée} - \text{Comptage électrode régénérée par PAM})}{\text{Comptage solution PAM}}$$

Si la radioactivité de l'électrode comptée par le détecteur est N_{el} exprimée en cpm, la radioactivité réelle déposée A , exprimée en dpm sera :

$$A_{dpm} = \frac{N_{el} \text{ cpm}}{E_{fPAM} \cdot F_a} = \frac{N_{el}}{E_f}$$

avec E_{fPAM} coefficient d'efficacité de comptage en solution de PAM (phase homogène)

E_f coefficient d'efficacité de comptage de l'électrode (phase hétérogène)

Ce facteur F_a permet de déterminer le coefficient d'efficacité du comptage par effet Cerenkov de l'électrode enzymatique comme le montre la figure 10, en fonction de la radioactivité déposée sur la membrane. Une courbe de quenching couleur est établie pour les solutions de PAM par la méthode de l'étalon interne (figure 11).

IV - RESULTATS

Les moyens que nous venons de décrire et les méthodes que nous avons adoptées vont nous permettre, à tout moment, d'évaluer l'activité des enzymes fixées sur les électrodes à partir du signal émis par celles-ci et de connaître avec précision la quantité d'inhibiteurs grâce aux éléments marqués. Nous allons pouvoir suivre le comportement des électrodes enzymatiques vis-à-vis de leur substrat, mettre en évidence l'action des inhibiteurs réversibles et irréversibles, chercher les moyens de régénérer l'enzyme une fois inhibée. Ceci nous conduit à étudier et à démontrer le mécanisme de la régénération spontanée de l'acétylcholinestérase, le mécanisme n'ayant jamais été prouvé jusqu'à maintenant. Nous proposons ensuite un modèle permettant de comprendre le comportement des électrodes enzymatiques destinées au dosage des inhibiteurs. Enfin ces capteurs à enzymes trouvent leur application dans le dosage des composés toxiques.

IV-1 - REPONSE DES ELECTRODES ENZYMATIQUES AUX SUBSTRATS

IV-1-1 - ELECTRODE A UREASE

L'électrode enzymatique est fabriquée selon la méthode précédemment décrite. Pendant la mesure, sa tête est immergée dans une solution tampon phosphate ou Tris - HCl pH = 7,4 à 0,25M, et son corps est relié à un enregistreur "TACUSSEL" équipé d'un tiroir électrométrique TVED. Les mesures sont effectuées dans une cellule thermorégularisée de 20 ml. Les solutions sont homogénéisées à l'aide d'une agitation magnétique.

L'étude et la mise au point de cette électrode ont fait l'objet d'un travail précédent (16) (52). On a pu montrer qu'en présence d'une solution d'urée au même pH que la solution tampon de référence, le potentiel de l'électrode à pCO_2 sur laquelle est fixée l'uréase atteint une valeur quasi-stationnaire au bout de 3 minutes environ. Cette réponse, exprimée en millivolts, est proportionnelle au logarithme de la concentration en urée dans les domaines de $10^{-4}M$ à $10^{-2}M$ (figure 11). La membrane silicone hydrophobe utilisée dans l'électrode à pCO_2 permet d'éviter l'interférence des substances ioniques, ce qui lui confère une bonne sélectivité.

IV-1-2 - ELECTRODE A ACETYLCHOLINESTERASE

La réalisation de cette électrode est une étape importante dans le domaine de la biotechnologie. Elle permet le dosage en continu de l'acétylcholine (18). Sa mise en oeuvre tant in vitro qu'in vivo ouvre la voie aux capteurs des neurotransmetteurs. Les essais de réponse de cette électrode enzymatique vis-à-vis du substrat : l'acétylcholine sont faits en branchant l'électrode sur un pHmètre et en enregistrant sa courbe de réponse. L'électrode de référence est une électrode au calomel. La figure 12 montre la réponse enregistrée en millivolts de l'électrode à AChE en fonction du temps pour différentes concentrations en acétylcholine dans

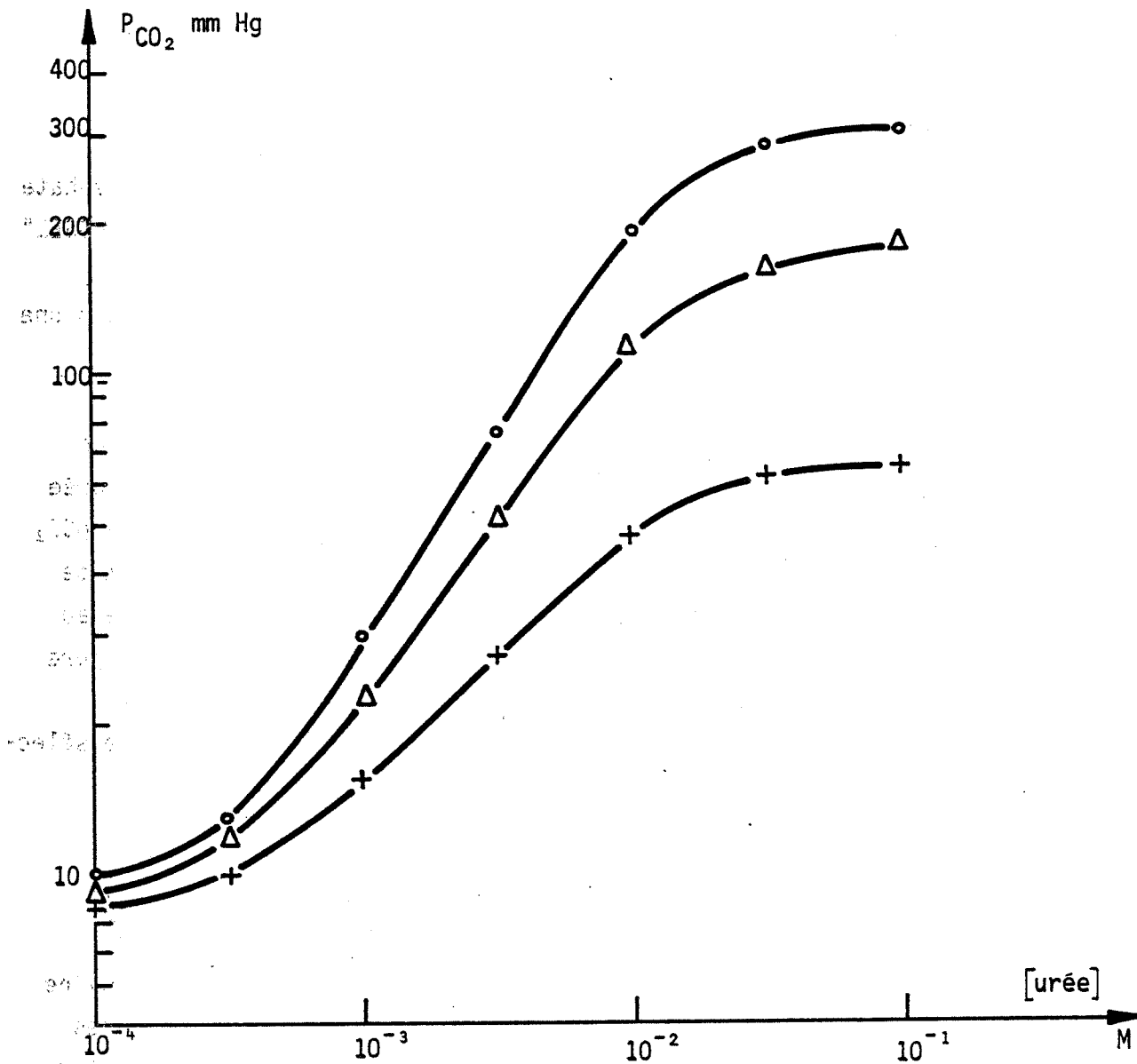


Figure 11 - Réponse de l'électrode à uréase en fonction de la concentration en urée pour différentes concentrations d'uréase fixée dans la couche active.

- + — + — + correspondant à 240 UI/cm³
 Δ — Δ — Δ correspondant à 360 UI/cm³
 o — o — o correspondant à 600 UI/cm³

un tampon phosphate 0,01M pH 8. Le pH de la solution tampon est pris comme état de référence. A chaque concentration en acétylcholine injectée correspond un palier d'équilibre atteint en 2 minutes environ. Cette électrode présente une bonne réversibilité.

La figure (13) montre l'évolution du pH traduit en millivolts au niveau de l'électrode et dans la solution externe. On peut remarquer que la présence de l'électrode ne perturbe pas le milieu environnant. Toute la réaction se déroule à l'intérieur de la couche active, la détection se fait à l'interface de la membrane enzymatique et de l'électrode, cela prouve la sensibilité de la méthode pour l'étude de ce microenvironnement.

La figure (14) donne la réponse de l'électrode vis-à-vis des différentes concentrations en acétylcholine pour différents pH du milieu. Quelque soit le pH, une zone linéaire se situe entre 10^{-4} et 10^{-2} M. Comme avec l'électrode d'uréase la courbe tend vers un plateau quand les concentrations du substrat dépassent la valeur du K_m correspondant à la vitesse maximale de la réaction enzymatique. Dans le domaine des très faibles concentrations en substrat $C_s < 10^{-4}$ M on approche de la limite de sensibilité de l'électrode et il n'y a plus proportionnalité entre le potentiel et le logarithme de la concentration en substrat.

La figure (15) exprime la réponse de l'électrode à AChE en fonction de la température pour une concentration d'acétylcholine de 10^{-2} M. Nous pouvons remarquer que la réponse du capteur est peu affectée par des variations de température comprises entre 10°C et 40°C. Au delà de 40°C il y a diminution de l'activité enzymatique probablement due au phénomène de dénaturation.

Après deux mois de fonctionnement à 25°C les électrodes ainsi fabriquées ont gardé plus de 90 % de leur activité enzymatique.

La figure 16 représente la variation du potentiel de l'électrode à AChE en fonction du pH du milieu pour une concentration du substrat égale à 10^{-2} M. Nous voyons que le pH optimal pour l'AChE immobilisée est proche de 8,1. Une courbe de comparaison avec l'enzyme en solution en l'absence d'albumine révèle un pH optimal de l'ordre de 7,6.

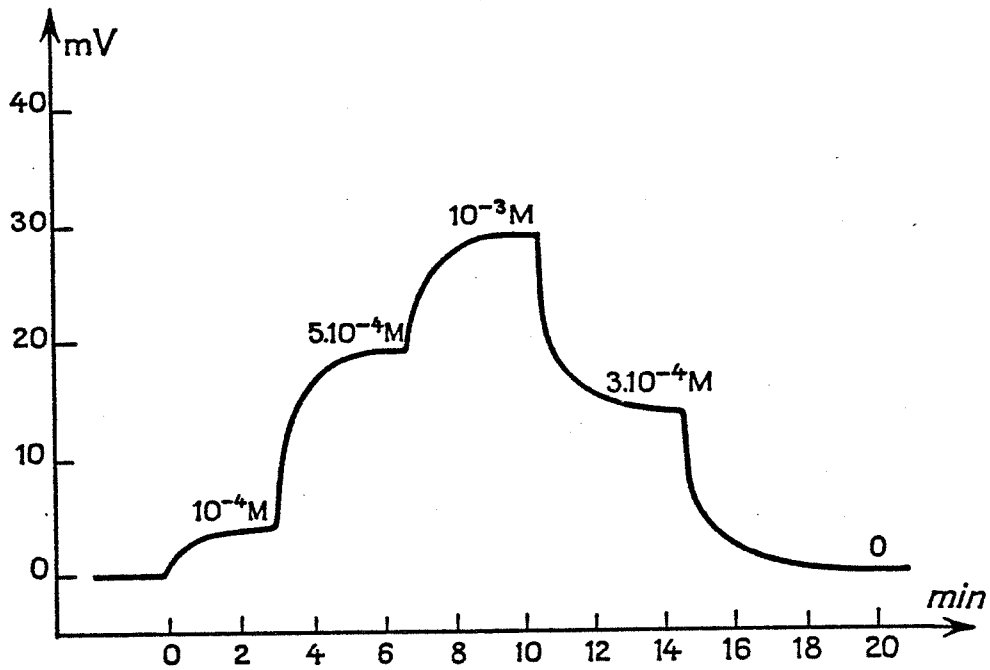


Figure 12 - Réponse de l'électrode à acétylcholinestérase en fonction du temps pour différentes concentrations en acétylcholine (moles/l) à 25°C dans un tampon phosphate 0,01M, pH = 8.

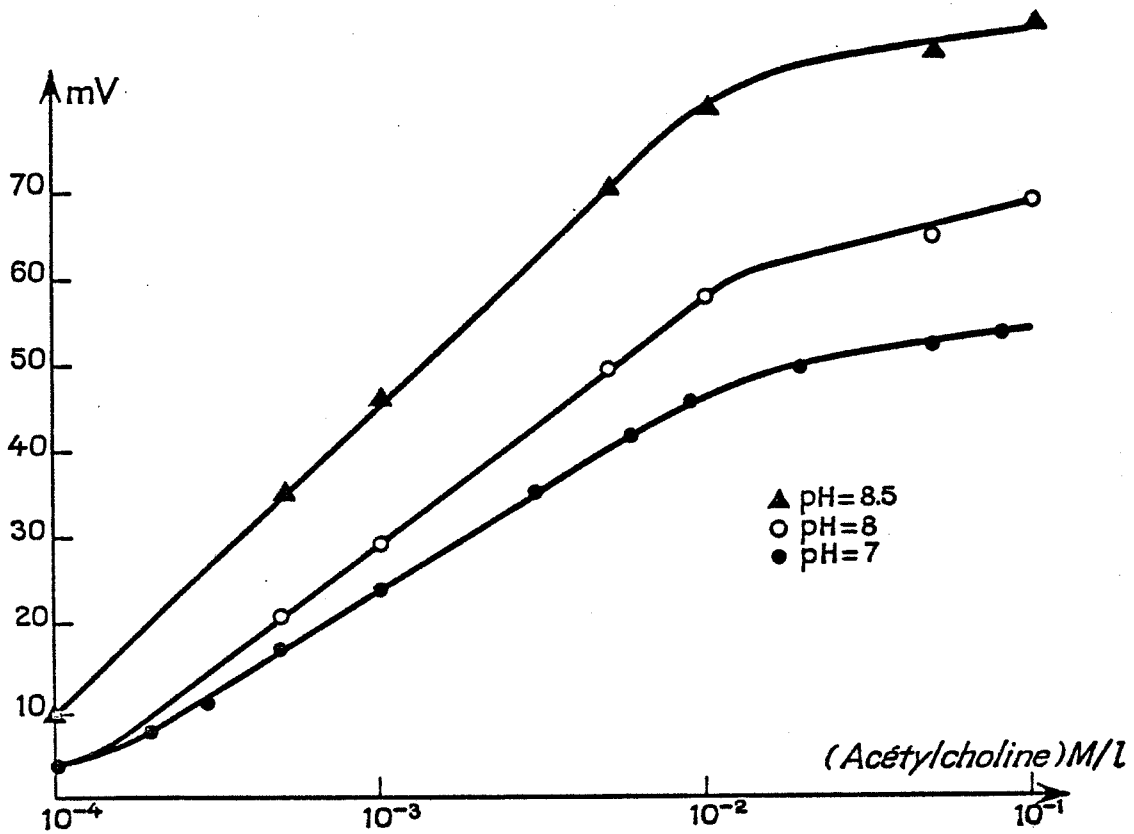


Figure 14 - Variation du potentiel de l'électrode à acétylcholinestérase en fonction des concentrations (moles/l) d'acétylcholine pour différents pH du milieu tampon à 25°C.

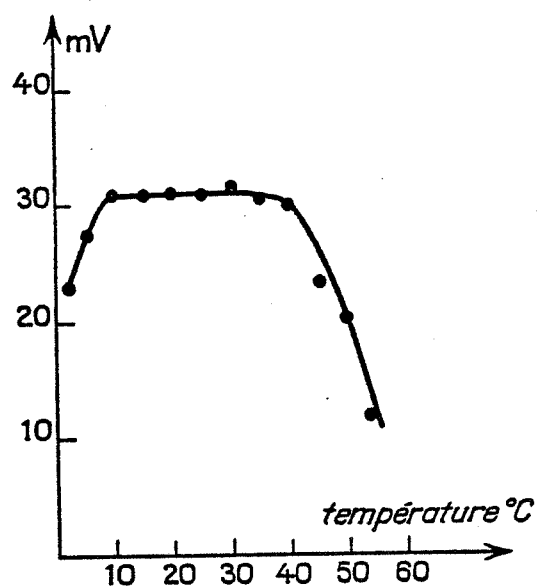


Figure 15 - Réponse de l'électrode à acétylcholine en fonction de la température pour une concentration d'acétylcholine de 10^{-2} M.

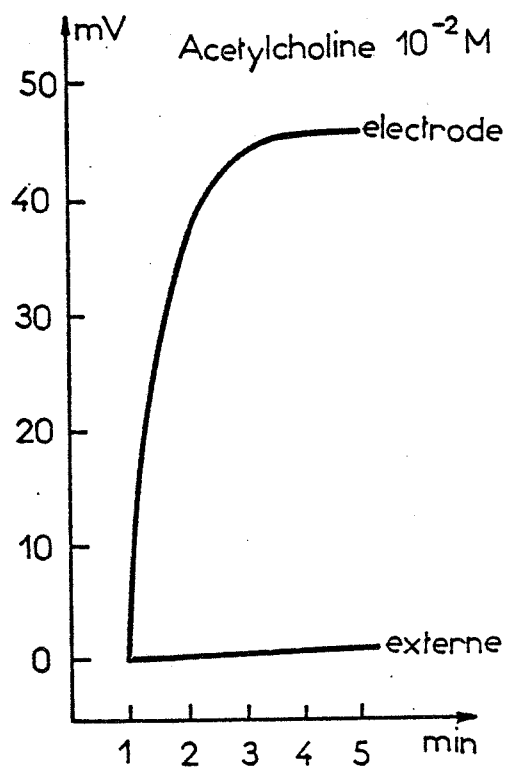


Figure 13 - Comparaison de l'évolution du pH exprimé en millivolts au niveau de l'électrode à AChE et dans la solution externe pour un volume réactionnel de 20 ml.

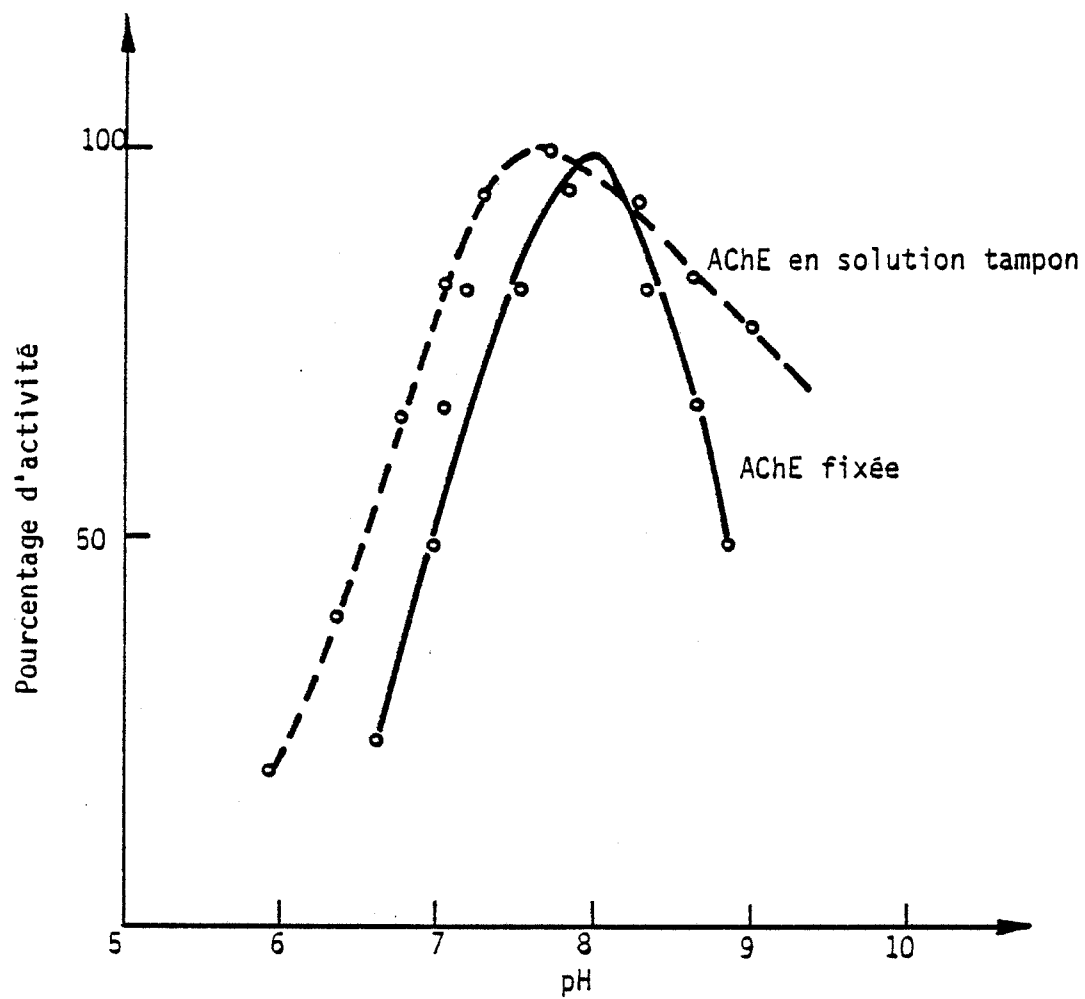


Figure 16 - Evolution du pourcentage d'activité de l'AChE immobilisée (—) et en solution (-----) en fonction du pH pour une concentration d'acétylcholine de 10^{-2} M.

Cet écart traduit l'influence des phénomènes de diffusion sur la cinétique enzymatique, entre autre l'accumulation locale du produit de la réaction ainsi que les phénomènes électrostatiques dus au potentiel de membrane. Des mesures par électrophorèse en solution d'une membrane finement broyée ont montré que cette dernière est faiblement chargée négativement.

IV-2 - ETUDE DES INHIBITEURS REVERSIBLES

L'activité de l'enzyme greffée au niveau de l'électrode est l'origine du signal recueilli. Cette activité est fonction de la concentration en enzyme active déposée sur l'électrode. L'intervention dans le milieu d'un inhibiteur bloque un certain nombre de sites actifs, ce qui revient à soustraire une partie de l'activité.

L'inhibition de l'activité enzymatique peut être caractérisée par un pourcentage d'inhibition :

$$I \% = \frac{A_i}{A_0} \times 100$$

où A_i représente l'activité de l'enzyme en présence de l'inhibiteur et A_0 son activité en l'absence d'inhibiteur pour une même concentration de substrat.

Le signal recueilli au niveau de l'électrode est alors dû à une activité résiduelle A_r :

$$A_r = 1 - \frac{A_i}{A_0}$$

Certains auteurs caractérisent l'inhibition par l'expression I_{50} qui représente la concentration en inhibiteur provoquant une inhibition de 50 % de l'activité enzymatique. Cette expression suppose que l'on soit à l'état d'équilibre entre l'inhibiteur et l'enzyme, ce qui n'est pas toujours vrai en pratique étant donné que la cinétique d'inhibition peut être souvent très lente.

Un certain nombre de composés inhibent de façon réversible les enzymes étudiées. Certains ont un mode d'action compétitif, c'est le cas des drogues telles que la nicotine de l'ésérine, de la prostigmine et de certains amino acides sur l'AChE, d'autres agissent suivant un mécanisme incompétitif, c'est le cas du fluor qui inhibe à la fois l'uréase et la cholinestérase (65) (66).

IV-2-1 - ACTION DE LA NICOTINE ET DE L'ARGININE

La figure (17) montre la réponse de l'électrode à AChE à 25°C lorsqu'on injecte dans la solution de substrat des quantités variables de nicotine. Nous voyons d'abord le palier correspondant à la réponse de l'électrode vis-à-vis de son substrat en excès : l'acétylcholine $10^{-2}M$, concentration correspondant à la vitesse maximale de la réaction enzymatique. Ensuite, nous voyons la réponse de l'électrode vis-à-vis des différentes concentrations en nicotine. Nous pouvons remarquer que le temps de réponse de l'électrode est de l'ordre de 3 minutes (aussi bien vis-à-vis du substrat que de l'inhibiteur) pour atteindre un palier correspondant à un état d'équilibre entre l'enzyme libre et l'enzyme inhibée, donc à un certain pourcentage d'inhibition de l'activité enzymatique.

Si l'on représente les différentes valeurs de potentiel d'équilibre en fonction de la concentration en nicotine, on obtient la figure 18 où l'on représente à gauche les valeurs de potentiel et à droite le pourcentage d'inhibition correspondant.

Cette inhibition cesse immédiatement, soit en l'absence d'inhibiteur, soit en présence d'un excès de substrat dans le milieu.

On retrouve ce type d'inhibition avec certains amino acides comme l'arginine. La courbe de la figure (19) montre les différentes valeurs prises par le potentiel d'équilibre en fonction de la concentration en arginine. D'après l'étude de NACHMANSON sur l'AChE en solution (60) l'arginine(L) a un pouvoir inhibiteur très marqué alors que le(D) est pratiquement inactif, or on remarque sur la courbe de la figure (9) que les deux stéréoisomères(D) et(L) ont le même pouvoir inhibiteur sur l'enzyme immobilisée. Il est possible que la réticulation supprime la stéréospécificité de l'enzyme par modification de sa conformation.

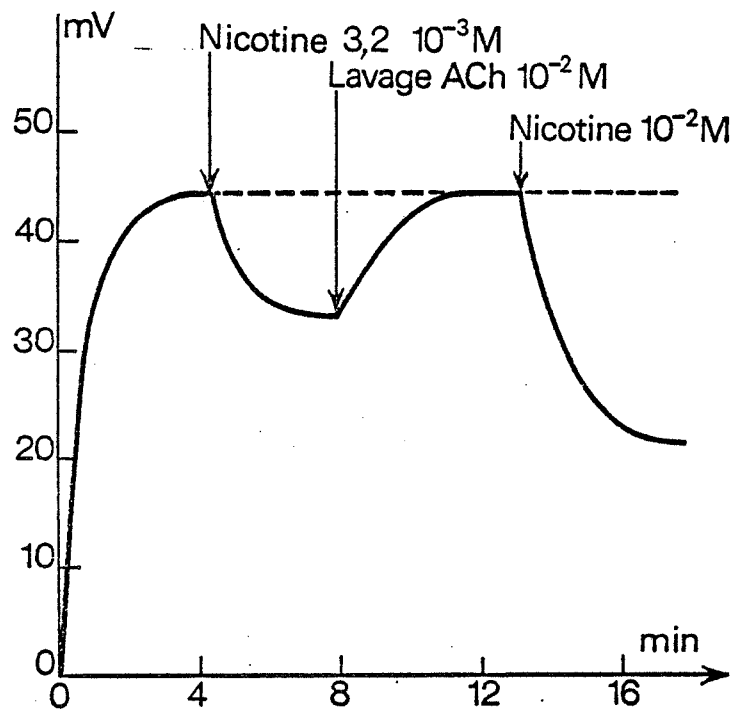


Figure 17 - Réponse de l'électrode à AChE en milieu chlorure d'acétylcholine 10^{-2} M, pH = 7,4 vis-à-vis de différentes concentrations en nicotine.

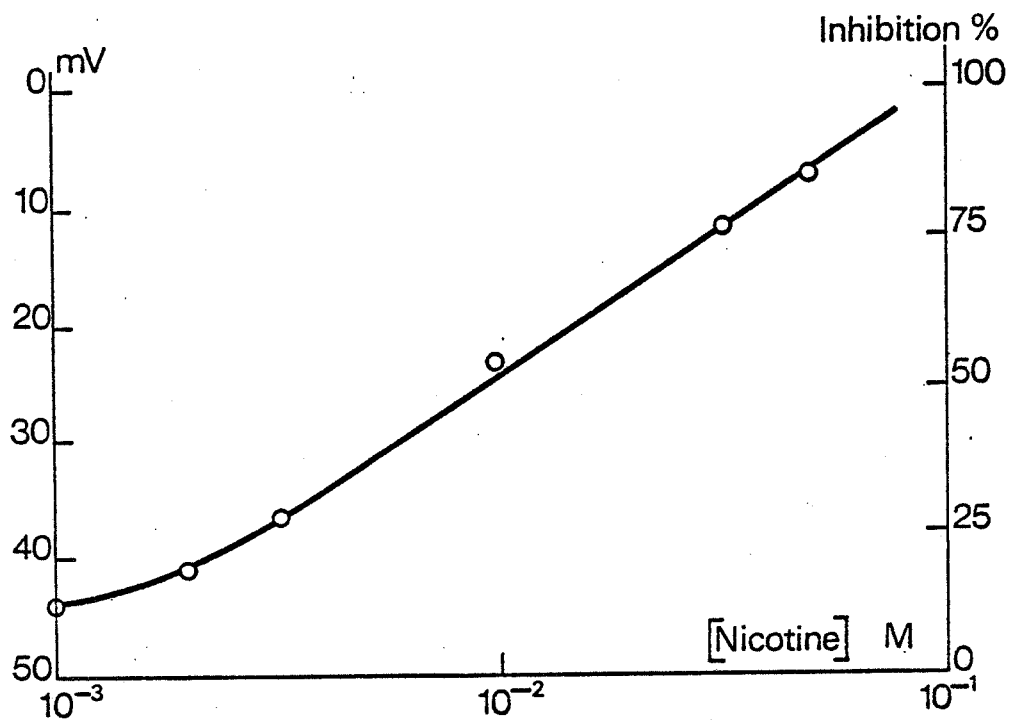


Figure 18 - Variation du potentiel de l'électrode à AChE en fonction des concentrations (moles/l) de nicotine en milieu chlorure d'acétylcholine 10^{-2} M pH = 7,4.

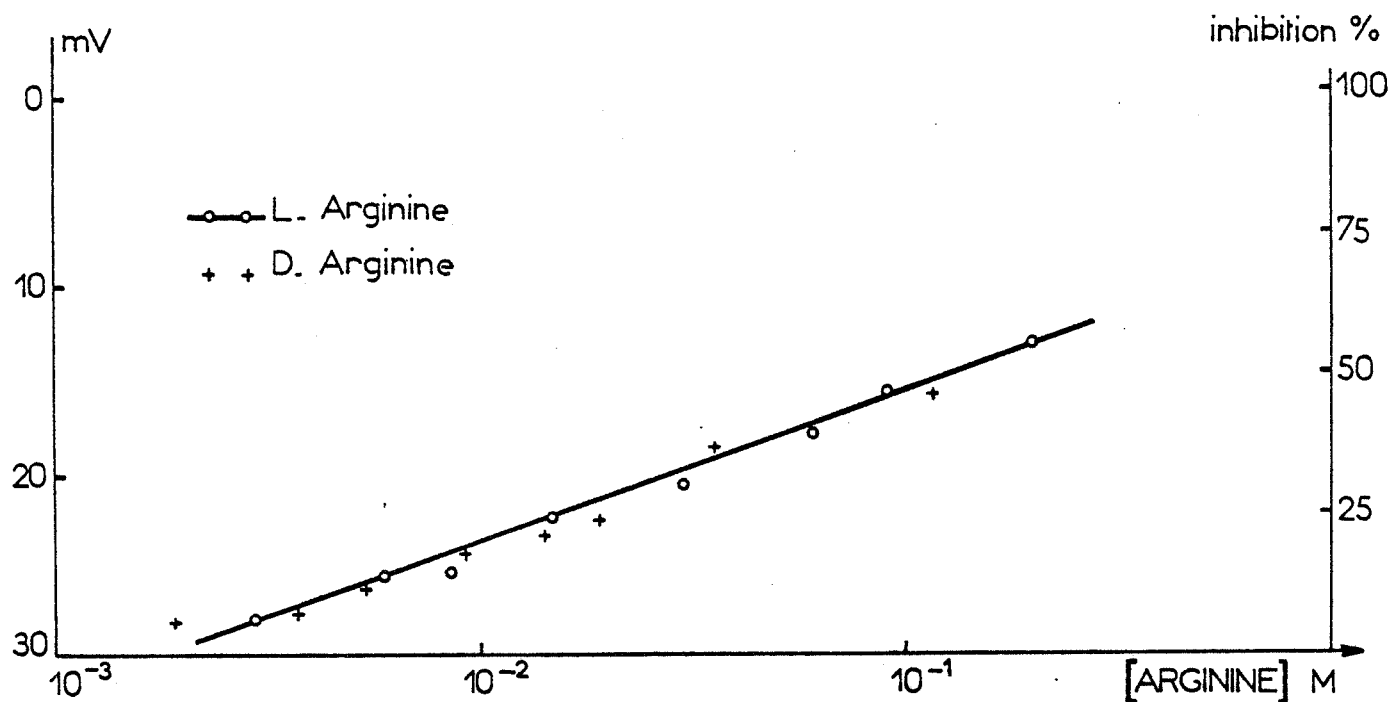
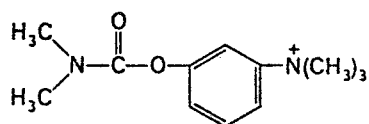
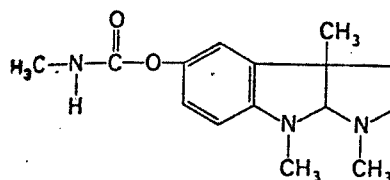


Figure 19 - Variation du potentiel de l'électrode à AChE en fonction des concentrations (mole/l) d'arginine en milieu chlorure d'acétylcholine 10⁻²M à pH 7,2.

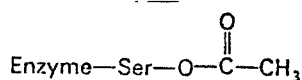


Neostigmine

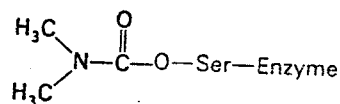


Physostigmine

Exemple de dérivés de l'acide carbamique



Complexe intermédiaire avec l'acétylcholine



Complexe intermédiaire formé avec les carbamates

Figure 20 - Comparaison du complexe acyl-enzyme intermédiaire formé lors de la réaction entre l'AChE et l'acétylcholine et entre l'AChE et les carbamates.

IV-2-2 - ACTION DES CARBAMATES

Certaines drogues dérivées de l'acide carbamique peuvent inhiber l'AChE à très faible teneur. L'AChE possède un résidu amino acide, la sérine avec un groupement OH au site actif qui intervient dans la décomposition de l'acétylcholine en choline. Ces inhibiteurs agissent d'une manière compétitive en formant un ester lié avec le groupement hydroxylique de la sérine comme le montre la figure (20). On voit que la réaction est proche de celle de l'hydrolyse de l'acétylcholine qui forme également avec l'AChE un complexe intermédiaire acyl-enzyme réversible. Les figures (21) et (22) expriment les réponses de l'électrode à AChE dans l'acétylcholine 10^{-2} M en présence de concentrations variables en néostigmine ou en physostigmine. Bien que ces substances ne soient pas physiologiques, on peut les assimiler à des substrats qui ont une affinité supérieure pour l'AChE que l'acétylcholine elle-même comme le prouve les courbes d'inhibition.

Ces drogues sont utilisées à très faibles teneurs en médecine comme parasympathomimétique, c'est-à-dire pour bloquer momentanément le système nerveux parasympathique.

- influence du pH

La figure (23) traduit l'effet d'inhibition de la néostigmine et de la physostigmine sur l'AChE immobilisée en fonction du pH du milieu. L'effet inhibiteur de la néostigmine décroît quand le pH diminue, la répartition des charges au niveau de cette molécule étant proche de celle de l'acétylcholine explique son comportement voisin. Au contraire, la physostigmine qui est une base faible ⁽⁶¹⁾ montre un effet inhibiteur accru vers les pH acides où elle acquiert des charges positives. Ceci est en accord avec l'existence, sur l'enzyme, d'une région chargée négativement qui contribue à la formation du complexe ⁽⁶²⁾.

- influence du temps de séjour de l'enzyme dans la solution d'albumine

La réponse des électrodes à AChE est modifiée suivant le temps de séjour de l'enzyme avec l'albumine avant la réticulation. Pour le mettre en évidence, on utilise le mode opératoire suivant : on dissout 11 mg d'AChE à 235 UI/mg dans 100 μ l d'une solution tampon phosphate 0,01 M pH = 7,4 à laquelle on ajoute 100 μ l d'albumine bovine à 17,5 %. Cette solution enzymatique est laissée séjourner à des temps variables à 4°C avant d'être utilisée pour la préparation des électrodes enzymatiques. On utilise le même mode de fabrication : (10 μ l de solution enzymatique + 15 μ l de solution de glutaraldéhyde à 12,5 % à un temps de réticulation de

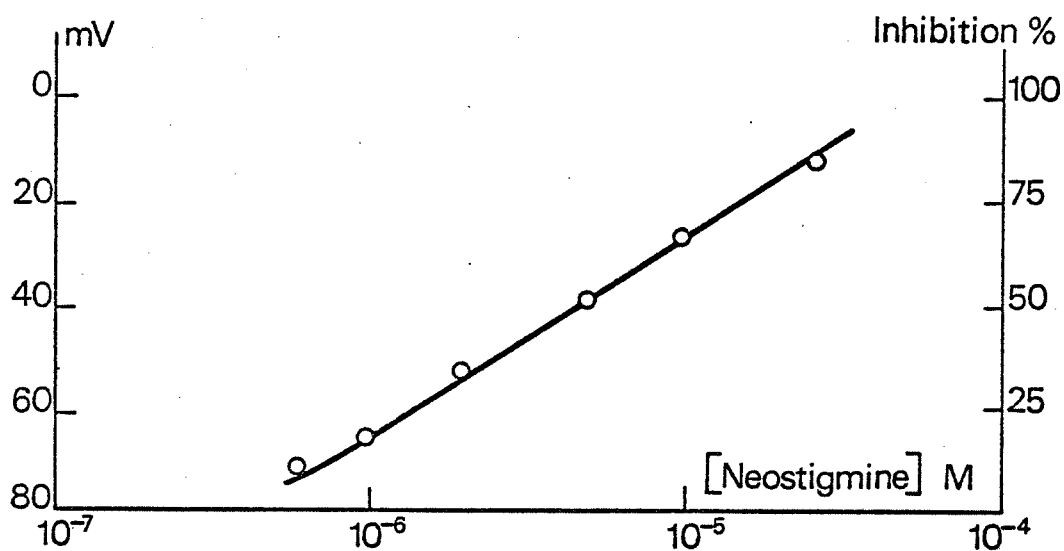


Figure 21 - Variation du potentiel de l'électrode à AChE en fonction des concentrations (moles/l) de néostigmine en milieu chlorure d'acétylcholine 10^{-2} M à pH = 8,5.

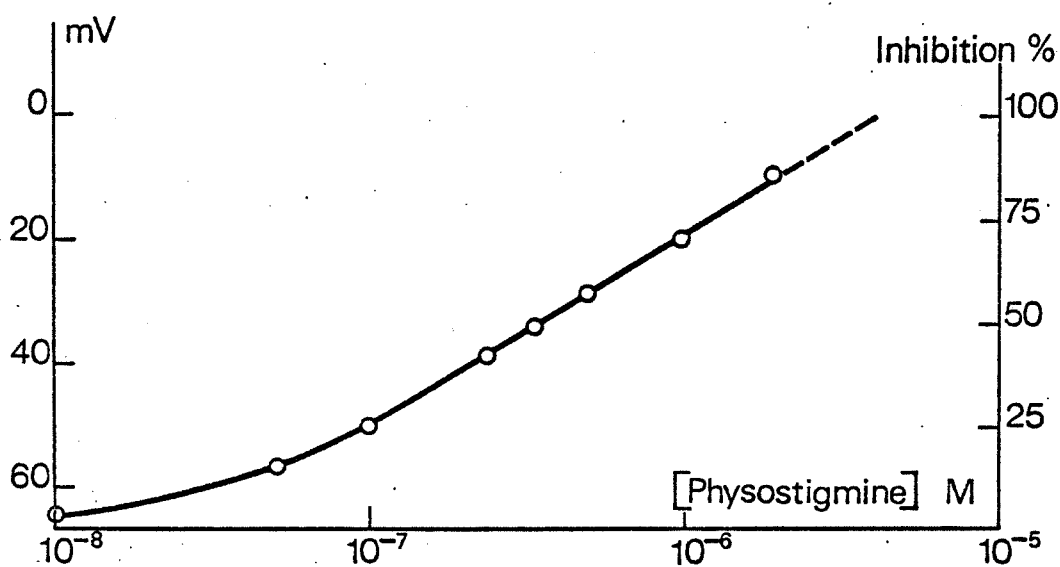


Figure 22 - Variation du potentiel de l'électrode à AChE en fonction des concentrations (moles/l) de physostigmine en milieu chlorure d'acétylcholine 10^{-2} M à pH = 6,8.

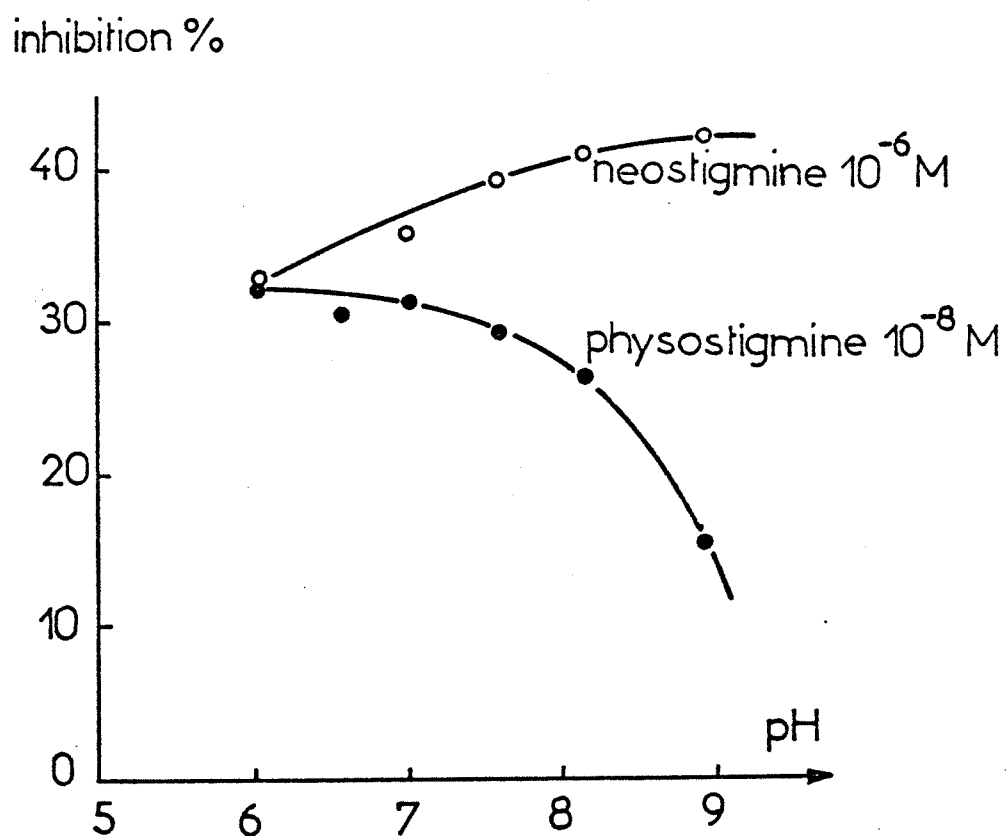


Figure 23 - Influence du pH sur l'inhibition de l'AChE immobilisée pour des solutions de physostigmine et de néostigmine.

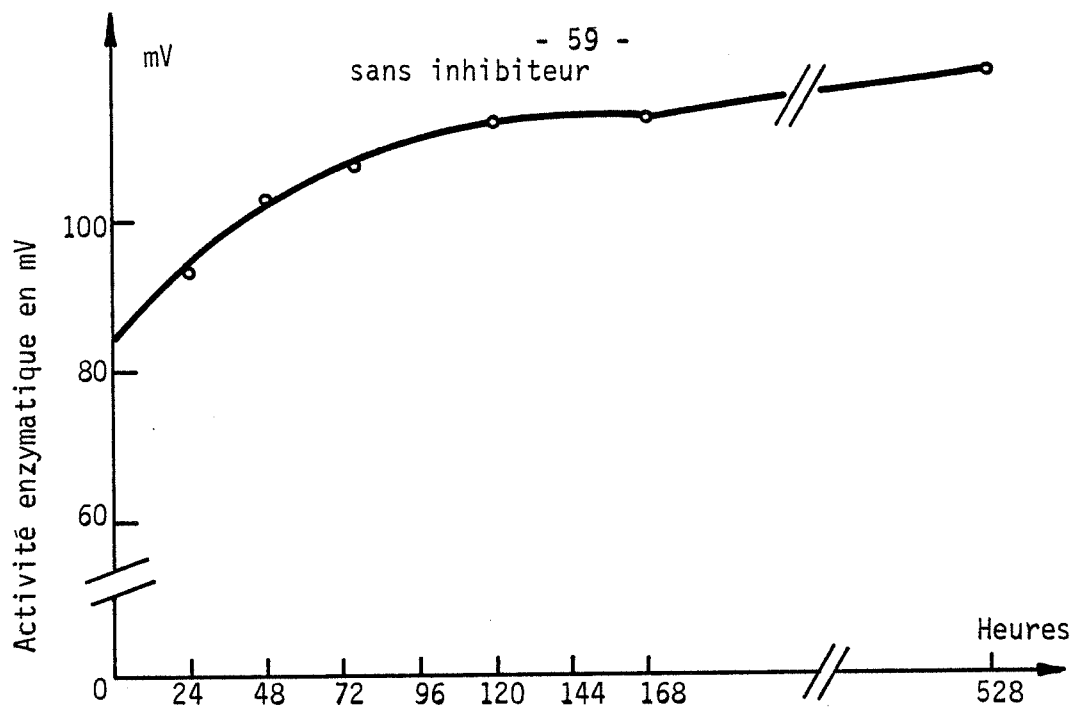


Figure 24 - Influence du temps de séjour de la cholinestérase dans la solution d'albumine avant la réticulation sur la réactivité de l'électrode préparée.

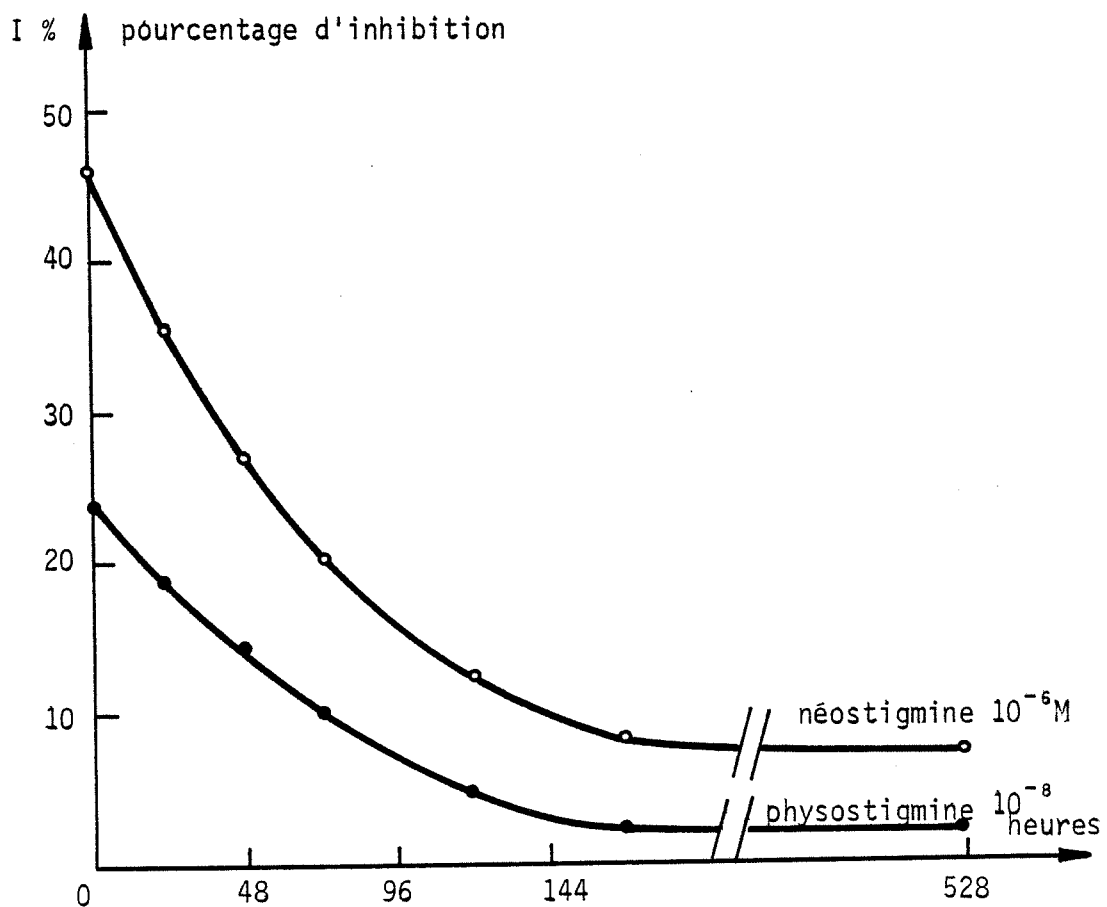


Figure 25 - Influence du temps de séjour de la cholinestérase dans la solution d'albumine avant réticulation sur l'inhibition par la néostigmine et la physostigmine.

15 minutes) et le même élément de verre sensible. Sur chaque électrode, plusieurs contrôles de l'activité enzymatique sont effectués avec l'acétylcholine 10^{-2} M seule, puis en présence des inhibiteurs : néostigmine 10^{-6} et physostigmine 10^{-8} .

On représente sur la figure 24 l'activité enzymatique exprimée en mV d'électrodes vis-à-vis de l'acétylcholine 10^{-2} M sans inhibiteur et sur la figure 25 l'action des inhibiteurs exprimée en % d'inhibition, en fonction du temps de séjour de l'enzyme dans la solution d'albumine. Le moment de solubilisation de l'enzyme dans l'albumine étant pris comme temps zéro, l'abscisse représentant le temps de séjour dans la solution d'albumine.

On constate :

- 1) une augmentation progressive de l'activité enzymatique au contact de la solution d'albumine qui tend vers une valeur limite.
- 2) une baisse de la sensibilité de l'enzyme vis-à-vis des deux inhibiteurs en fonction du temps de présence de l'enzyme dans la solution d'albumine.
- 3) une fois réticulée, la membrane enzymatique ne montre aucune évolution ni de l'activité enzymatique, ni de la sensibilité aux inhibiteurs.

Ces expériences laissent penser que l'albumine a une action lente sur l'enzyme en solution en augmentant son activité enzymatique avant que l'enzyme ne soit réticulée. Elle jouerait, en outre, un rôle protecteur de l'enzyme vis-à-vis des inhibiteurs. Après réticulation, le système enzyme-albumine est bloqué dans une conformation qui lui empêche toute évolution.

- Influence du temps d'incubation de l'électrode enzymatique en présence de l'inhibiteur

Si l'on fait incuber l'électrode enzymatique dans une solution tampon de néostigmine ou de physostigmine, avant d'introduire l'acétylcholine le pourcentage d'inhibition est supérieur à celui obtenu sans incubation. La figure 26 exprime le pourcentage d'inhibition de l'AChE immobilisée en fonction de la concentration de physostigmine pour divers temps d'incubation. En laissant incuber l'inhibiteur, on favorise la formation du complexe enzyme-inhibiteur au détriment du complexe enzyme-substrat, ce qui se traduit par un déplacement du seuil de détection de l'électrode enzymatique vers les faibles concentrations en inhibiteurs.

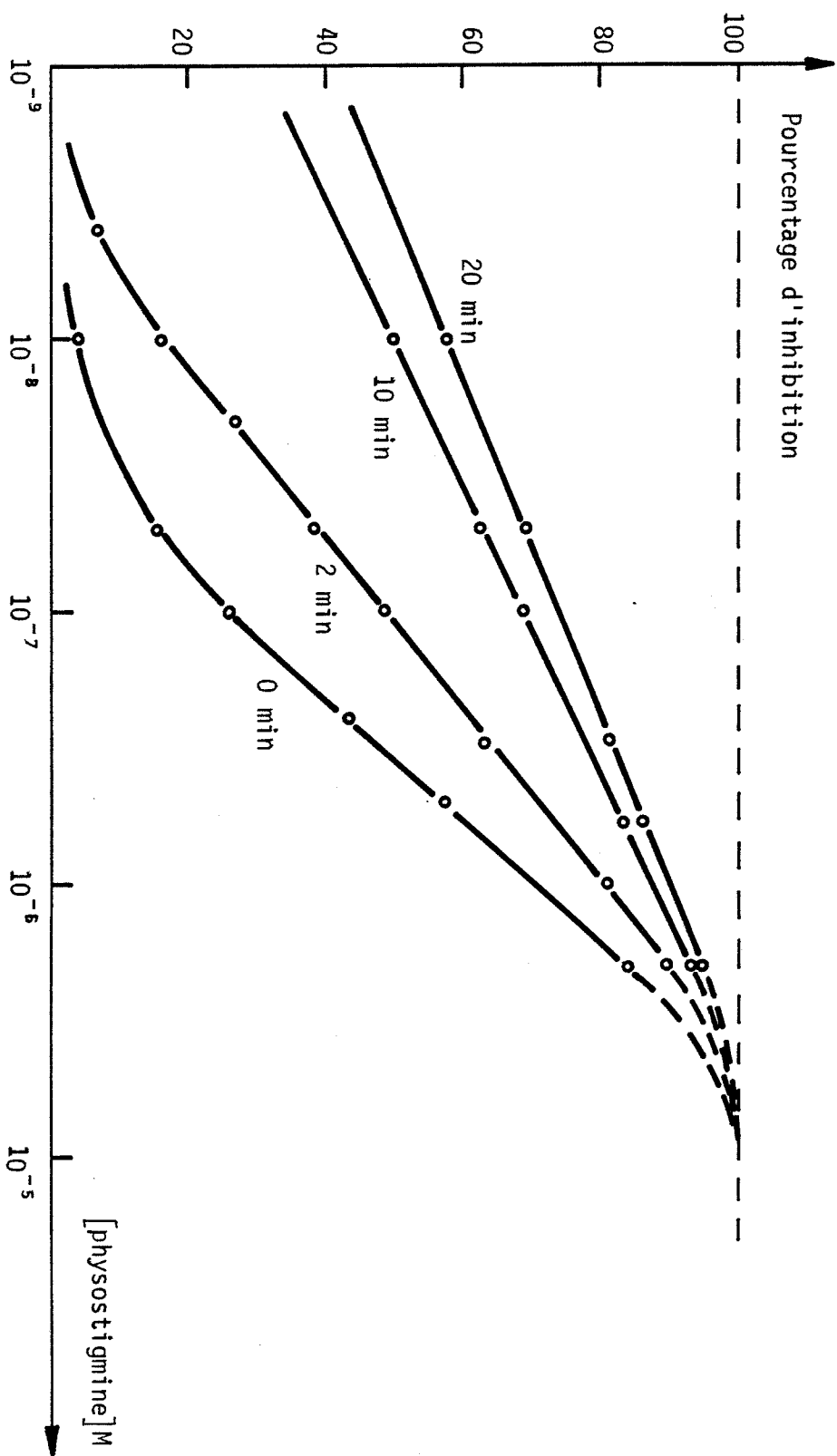


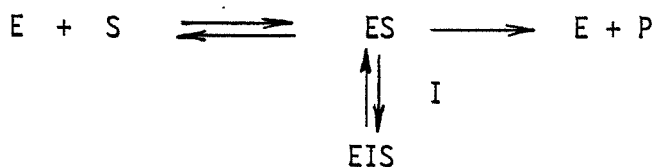
Figure 26 - Variation du pourcentage d'inhibition de l'électrode d'AChE en fonction de la concentration en physostigmine (mole/l) pour différents temps d'incubation.

IV-2-3 - ACTION DU FLUOR

La fluorose connue pour engendrer des taches au niveau de l'émail dentaire et des atteintes du squelette, est une maladie causée par des surconcentrations d'ions fluor dans l'entourage des cellules. Ce dérangement de la fonction cellulaire est en relation directe avec les effets inhibiteurs de l'ion fluor sur les systèmes enzymatiques. Si ces effets nocifs sont bien constatés et les maladies décrites, la littérature est peu abondante au niveau enzymologique. Le fluor est un inhibiteur commun de l'uréase et de la cholinestérase ⁽⁶³⁾ ⁽⁶⁴⁾ mais son mode d'action est controversé.

Lorsqu'on injecte une solution de fluorure de sodium dans la solution d'urée $10^{-2}M$ dans laquelle plonge une électrode d'uréase dont le potentiel est fixé, le signal de l'électrode se stabilise rapidement (en moins de 5 minutes) à un potentiel inférieur. Dès que la concentration en fluorure diminue dans le milieu réactionnel, le potentiel remonte et peut regagner sa valeur initiale si les ions fluorures disparaissent totalement. La figure 27 représente la réponse donnée par l'électrode à uréase pour des concentrations variables de fluorure de sodium et traduit la réversibilité de l'inhibition. Comme dans les cas précédents on peut exprimer les différentes valeurs de potentiel d'équilibre ou les pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration en fluorure (figure 28).

A la différence des inhibiteurs précédents, le temps d'incubation ne favorise pas l'inhibition. La figure 29 montre la réponse de l'électrode à uréase pour différents temps d'incubation et le signal délivré lorsqu'on injecte dans la solution d'urée la même concentration de fluorure : $5.10^{-3}M$. On constate, qu'avec ou sans temps d'incubation le palier d'équilibre d'inhibition est le même, ainsi que la réversibilité. Ceci s'explique par le mécanisme d'inhibition. J. BEAUX ⁽⁶⁶⁾ a montré grâce à l'électrode à uréase que l'inhibition est un mécanisme compétitif :



L'inhibition ne pouvant se faire qu'en présence du substrat.

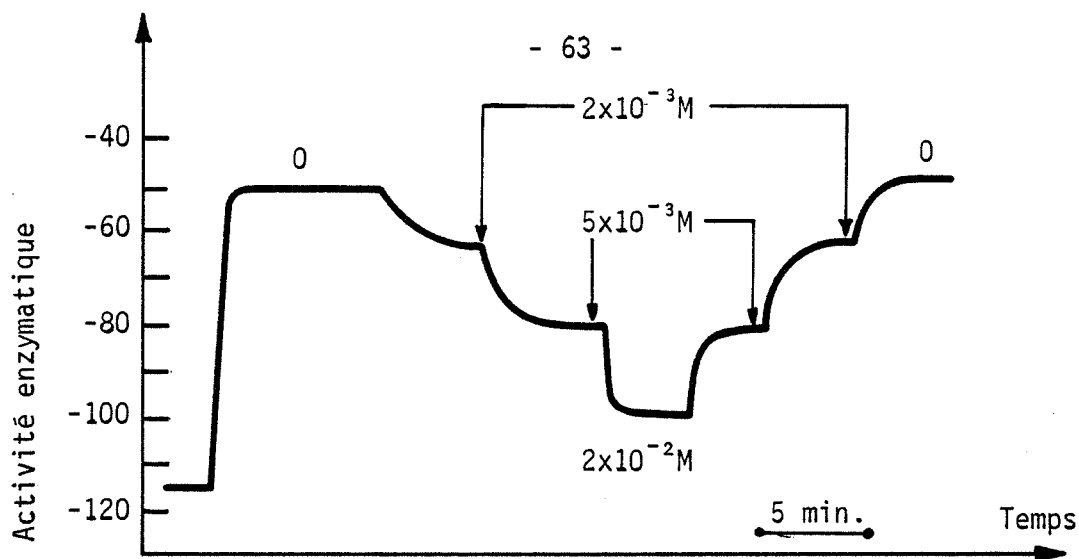


Figure 27 - Réponse de l'électrode à uréase aux ions fluorures dans un tampon phosphate contenant 10⁻²M d'urée

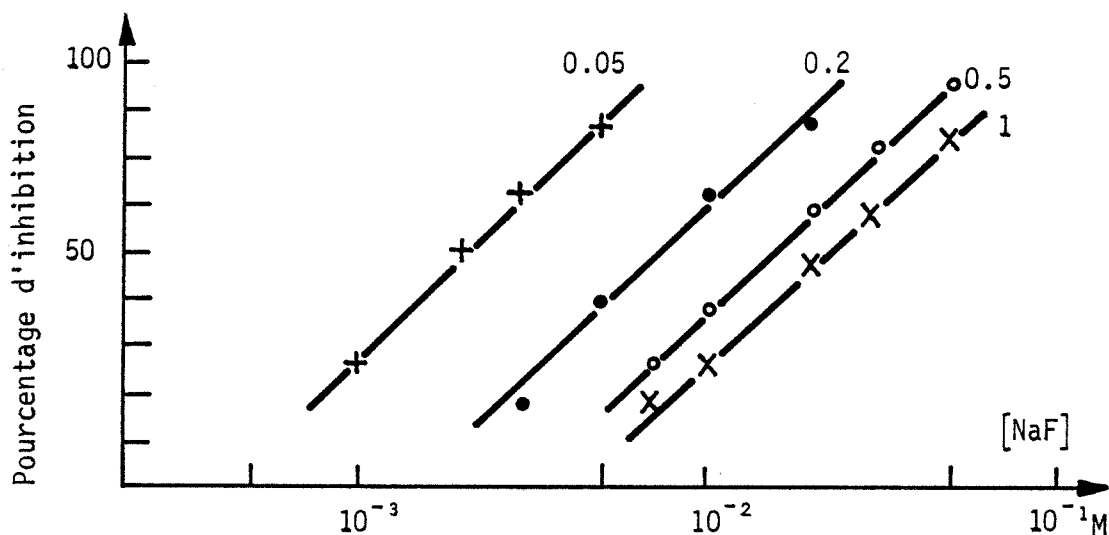


Figure 28 - Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de fluorure de sodium pour différentes quantités d'urée immobilisée (nb d'unités)

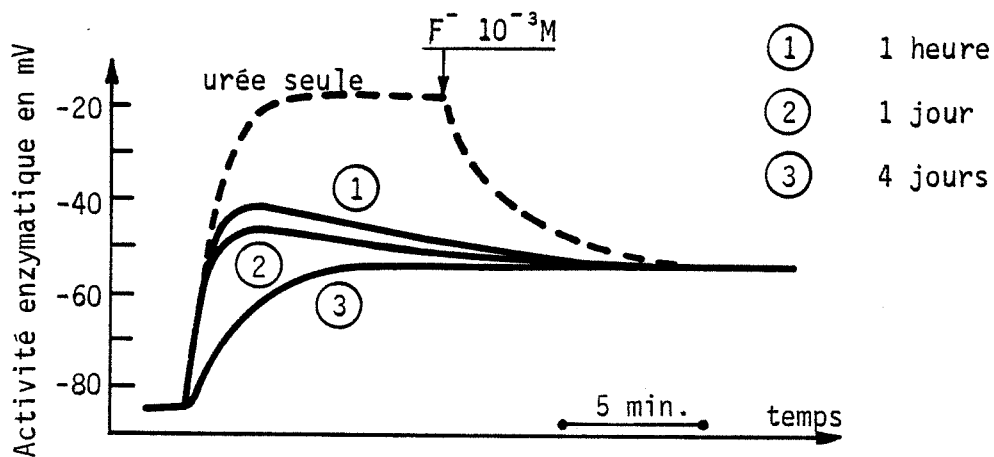


Figure 29 - Effet du temps d'incubation sur la réponse de l'électrode à uréase aux ions fluorures [F⁻] = 5.10⁻³M dans l'urée 10⁻²M

IV-3 - ETUDE DES INHIBITEURS IRREVERSIBLES

Si les composés précédents inhibent avec des concentrations parfois très faibles les enzymes, ils ont cependant le mérite d'avoir une action réversible, ce qui leur confère au niveau de l'organisme toutes proportions gardées, une toxicité relativement limitée. Par contre, un certain nombre de substances, en particulier les ions métalliques ou certains dérivés organophosphorés forment avec l'enzyme un complexe qui ne permet pas une régénération immédiate de l'activité enzymatique lorsque la concentration de l'inhibiteur dans le milieu devient plus faible. On les classe habituellement comme des inhibiteurs irréversibles.

IV-3-1 - ACTION DES IONS METALLIQUES

Les médecins savent qu'un certain nombre de maladies et de troubles métaboliques sont dûs à un manque ou à un excès d'ions métalliques dans l'organisme. Cependant, il faut reconnaître que le rôle réel de nombreux oligoéléments est mal connu. Certains comme le sodium, le calcium ou le potassium sont essentiels et participent aux échanges ioniques, d'autres comme les ions lourds extrêmement toxiques au delà d'une certaine teneur deviennent des inhibiteurs des enzymes.

Les effets inhibiteurs des ions métalliques furent étudiés sur l'uréase et la cholinestérase en solution ^{(19) (20) (21) (22) (67) (68)}. Des études au niveau du suc gastrique des ruminants ⁽⁶⁸⁾ ou de cellules intactes ⁽⁶⁹⁾ mentionnent que certains ions peuvent agir comme activateur. D'autre part, la nature réversible de l'inhibition est incertaine.

Tous ces travaux sur les enzymes en solution ont tous eu en commun la difficulté de récupérer l'enzyme après l'action de l'inhibiteur et de suivre ensuite l'évolution de l'intoxication.

Nous nous sommes donc fixés pour but de suivre au moyen de notre méthode expérimentale les effets causés par l'accumulation de ces inhibiteurs sur la membrane enzymatique et également son éventuelle régénération.

Dans une étude précédente (52) nous avons mis en évidence l'effet inhibiteur des ions cobalt sur une membrane d'uréase au moyen d'une électrode enzymatique, en présence d'une solution d'urée $10^{-2}M$: la présence des ions cobalt donne lieu à une réduction de l'amplitude du signal délivré par l'électrode. L'inhibition est lente et augmente avec le temps d'incubation. Une étude à l'aide des traceurs radioactifs utilisant l'isotope 57 du cobalt nous a permis de constater que le cobalt en se fixant sur la membrane enzymatique était responsable de son inhibition irréversible proportionnellement à la concentration en cobalt fixé. Cela nous a permis de mettre au point une méthode analytique de dosage par dilution isotopique substoechiométrique en exploitant l'affinité que possède l'enzyme pour cet ion. Nous étendons maintenant l'étude à l'argent et au mercure connus pour être très nocifs et constituant une menace pour les organismes, compte tenu de l'accroissement de leur teneur dans l'environnement.

IV-3-1-1 - Action du mercure sur l'uréase

CONDITIONS EXPERIMENTALES : pour la présente étude les membranes enzymatiques d'uréase greffées sur les électrodes à pCO_2 ont été réticulées en l'absence d'albumine. Cette protéine riche en groupements SH fixe abondamment les ions Hg^{2+} et Ag^+ de sorte qu'en sa présence la réponse de la membrane enzymatique est totalement faussée. On réticule donc directement l'uréase en solution concentrée dans du tampon phosphate avec du glutaraldéhyde à 25 %. On prolonge le temps de réticulation à 30 minutes. Cette opération est possible car l'uréase est une grosse molécule qui peut réaliser des ponts sur elle même et d'autre part elle a une bonne résistance au glutaraldéhyde à concentrations élevées, contrairement à l'AChE plus fragile qui demande une protéine de charge.

Les mesures sont réalisées à l'aide de l'électrode qui plonge dans la cellule réactionnelle. Pour les essais d'inhibition des solutions de $HgCl_2$ de concentrations variant de $10^{-5}M$ à $10^{-8}M$ sont injectées dans la cellule à une température de $25^\circ C$ et un $pH = 7,4$. Au temps défini la cellule est vidée de la solution inhibitrice, l'électrode est lavée avec un jet de solution tampon, et l'activité enzymatique est testée avec une solution d'urée $10^{-2}M$.

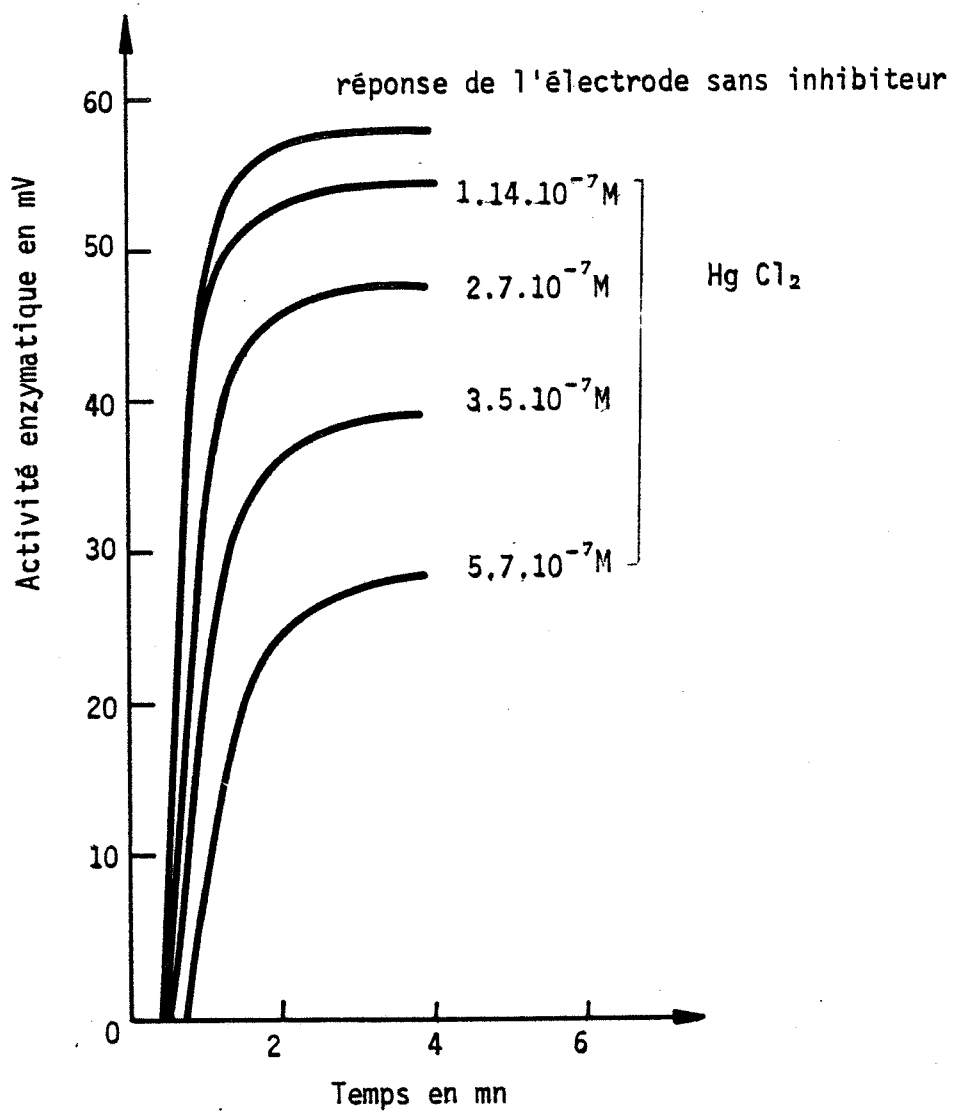


Figure 30 - Réponse d'une électrode d'uréase en fonction du temps pour différentes concentrations en HgCl₂

- temps d'incubation : 10 min
- urée $10^{-2} M$
- pH = 7,2

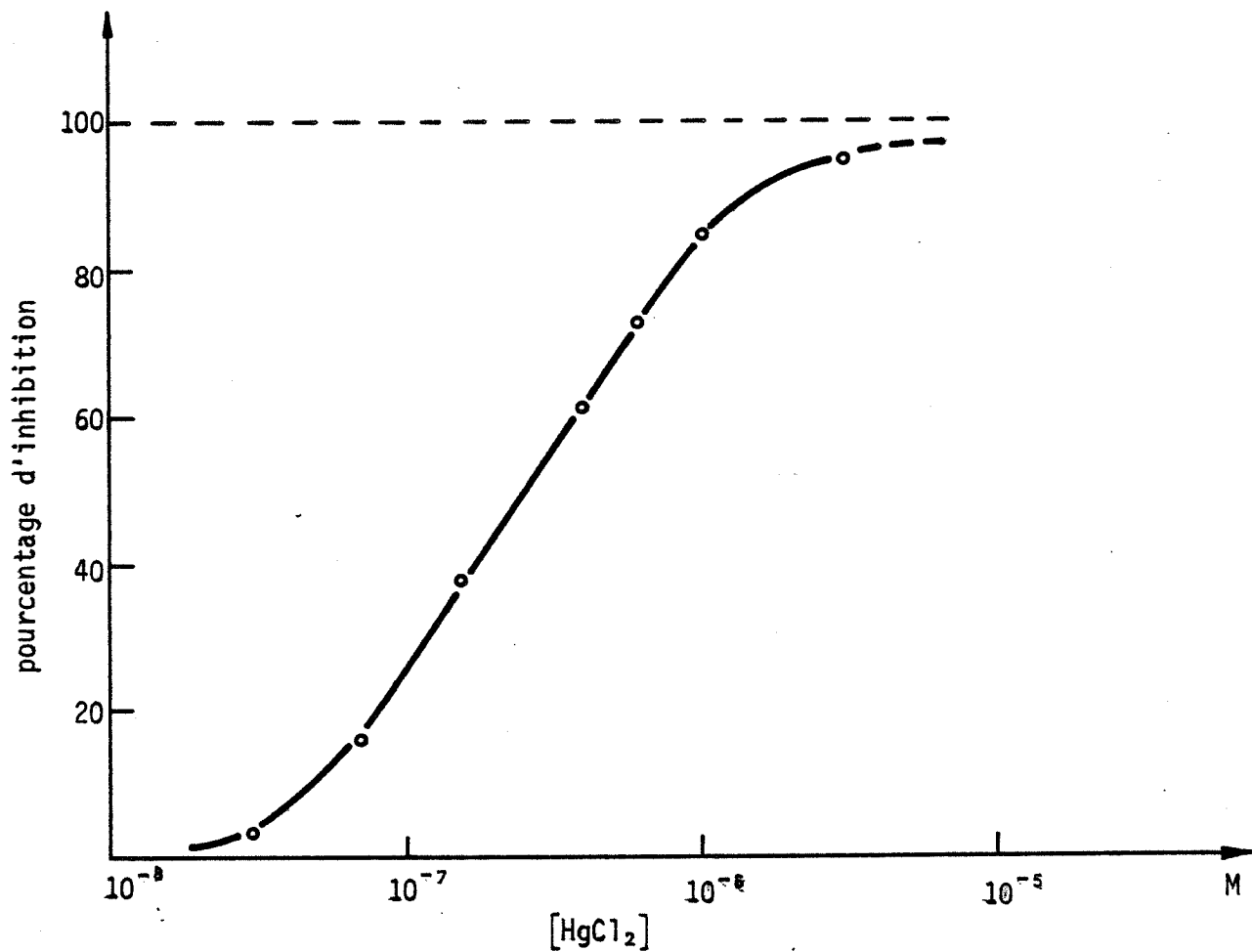


Figure 31 - Variation du % d'inhibition d'une membrane d'uréase en fonction de la concentration: d' HgCl_2 (mole/l) pour un temps d'incubation de 10 min. à pH = 7,2.

RESULTATS :

La figure 30 montre la réponse d'une électrode à uréase lorsque celle-ci a incubé pendant dix minutes dans diverses solutions d' HgCl_2 de concentrations variables. A la différence des réactions avec les inhibiteurs précédents, on constate que l'injection de HgCl_2 ne provoque pas de chute immédiate du potentiel. Une incubation préalable avec l'inhibiteur est nécessaire. De plus, lorsque la concentration en inhibiteur diminue ou s'annule, le nouveau potentiel conserve sa valeur et traduit l'irréversibilité de l'inhibition. Si on représente les différentes valeurs du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en ion Hg^{2+} on obtient la figure 31 pour un temps d'incubation toujours égal à dix minutes.

La figure 32 représente l'évolution de l'inhibition en fonction du temps pour une concentration de chlorure mercurique de 10^{-7}M . On peut constater qu'à cette concentration la réaction entre l'enzyme et l'inhibiteur peut s'écrire :



$$-\frac{d[\text{E}]}{dt} = k[\text{I}][\text{E}]$$

en considérant que l'inhibiteur est en excès vis-à-vis de l'enzyme $\rightarrow [\text{I}] \approx \text{Cte}$

$$-\frac{d[\text{E}]}{dt} = k'[\text{E}] \quad \log \frac{[\text{E}]}{[\text{E}]_0} = -k' t \quad \text{avec } k' = k \cdot [\text{I}]$$

comme l'activité enzymatique est proportionnelle à la concentration de CO_2 dégagée.

$$(E = K p_{\text{CO}_2}) \quad \log \frac{[p_{\text{CO}_2}]}{[p_{\text{CO}_2}]_0} = k' t$$

$$\text{on trouve } k = \frac{k'}{[\text{I}]} = 9.6 \cdot 10^4 \text{ l.mole}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

Pour connaître la quantité réelle d'ions mercuriques stockées au niveau de la membrane et responsable de la baisse de l'activité enzymatique, nous avons utilisé le mercure 203 radioactif comme traceur de la solution inhibitrice. Le processus expérimental est analogue au précédent. La tête enzymatique de l'électrode incube dans une solution de chlorure mercurique contenant $0,05 \mu\text{Ci}$ de ^{203}Hg . A la fin du temps d'incubation, l'électrode est abondamment lavée, la radioactivité est mesurée au compteur puits et l'activité enzymatique est testée avec une solution d'urée 10^{-2}M . La figure 33 nous permet de corréliser la quantité de mercure déposée au niveau de la membrane et son activité enzymatique. On voit que la baisse de l'activité enzymatique est une fonction linéaire de la quantité de mercure, fixée au niveau de la membrane. Cela permet de supposer que tous les sites de l'enzyme

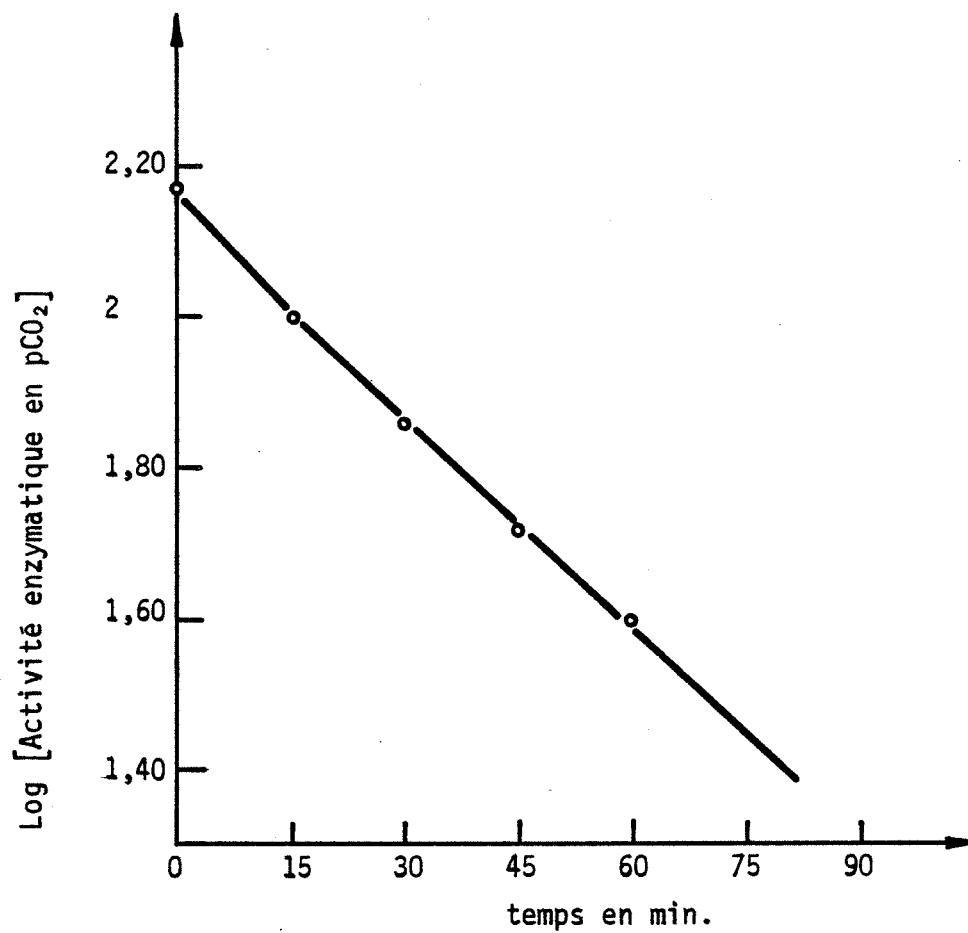
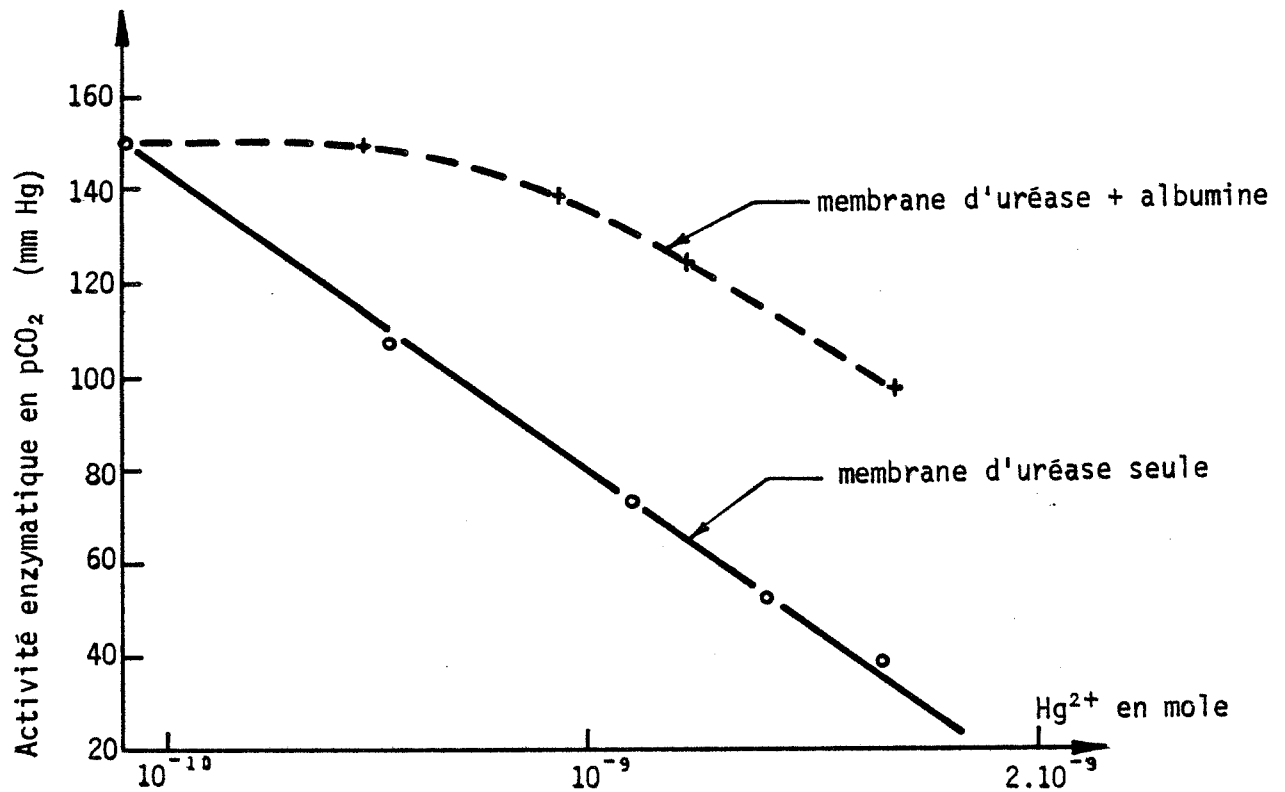


Figure 32 - Evolution de l'activité enzymatique d'une membrane d'uréase (10,5 unités immobilisées) inhibée avec des solutions d' HgCl_2 10^{-7}M en fonction du temps d'incubation pH = 7,2.



-Figure 33 - Variation de l'activité d'une électrode à uréase exprimée en pression de pCO_2 en fonction de la quantité d'ions mercuriques déposés au niveau de la membrane. Comparaison de la réponse d'une membrane enzymatique fabriquée avec l'uréease seule et en présence d'albumine.

ont la même affinité pour les ions mercuriques et que la baisse d'activité traduit parfaitement la présence de ces ions au niveau de la membrane. La comparaison avec une membrane d'uréase réticulée avec de l'albumine comme protéine de charge montre bien que les ions mercuriques se fixent à la fois sur l'enzyme et sur l'albumine. Cette dernière jouant ainsi un rôle protecteur vis-à-vis des sites enzymatiques actifs.

Lorsqu'on suit au cours du temps l'activité enzymatique d'une électrode à uréase inhibée au préalable pendant dix minutes dans une solution de $^{203}\text{Hg Cl}_2$ 10^{-7}M on constate une réponse constante pour une solution d'urée 10^{-2}M . De même les mesures de radioactivité de l'électrode donnent un taux constant au cours du temps malgré un lavage en continu de la membrane enzymatique. Cela traduit le caractère irréversible de l'inhibition de l'uréase par les ions mercuriques. Comme le cobalt, le mercure forme avec l'enzyme un complexe très stable qui ne peut se dissocier spontanément au cours du temps.

Cet effet irréversible nous a conduit à rechercher un agent capable d'extraire le mercure de la membrane et de restituer l'activité enzymatique initiale.

Les sulfures sont connus pour précipiter les ions métalliques et notamment les ions mercuriques (produit de solubilité 4.10^{-53}) (75). L'utilisation du sulfure d'ammonium nous permettra d'extraire le mercure de la membrane sans altérer l'activité enzymatique.

La membrane d'uréase inhibée par les ions mercuriques est traitée en continu par une solution tamponnée de polysulfure d'ammonium 10^{-3}M pH 7 pendant dix minutes. Après lavage, la tête de l'électrode est replacée dans une solution de tampon et devient prête à l'emploi.

La figure 35 montre la désorption de l'inhibiteur au niveau de la membrane suivi par la mesure de la radioactivité lors de l'intervention du sulfure d'ammonium. La figure 36 représente la restitution de l'activité enzymatique exprimée par la réponse de l'électrode.

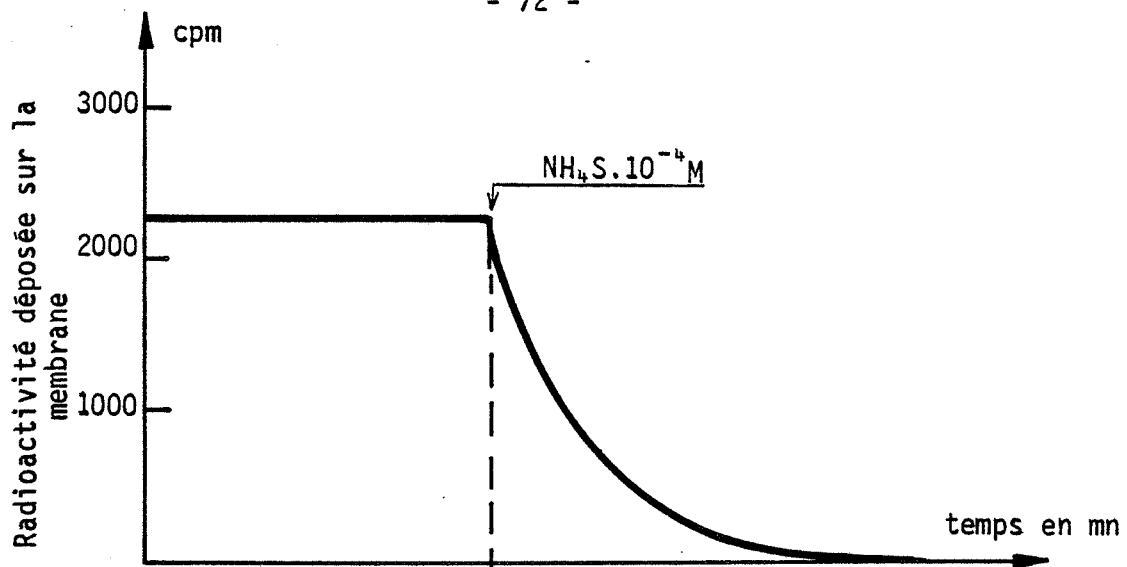


FIG. 35

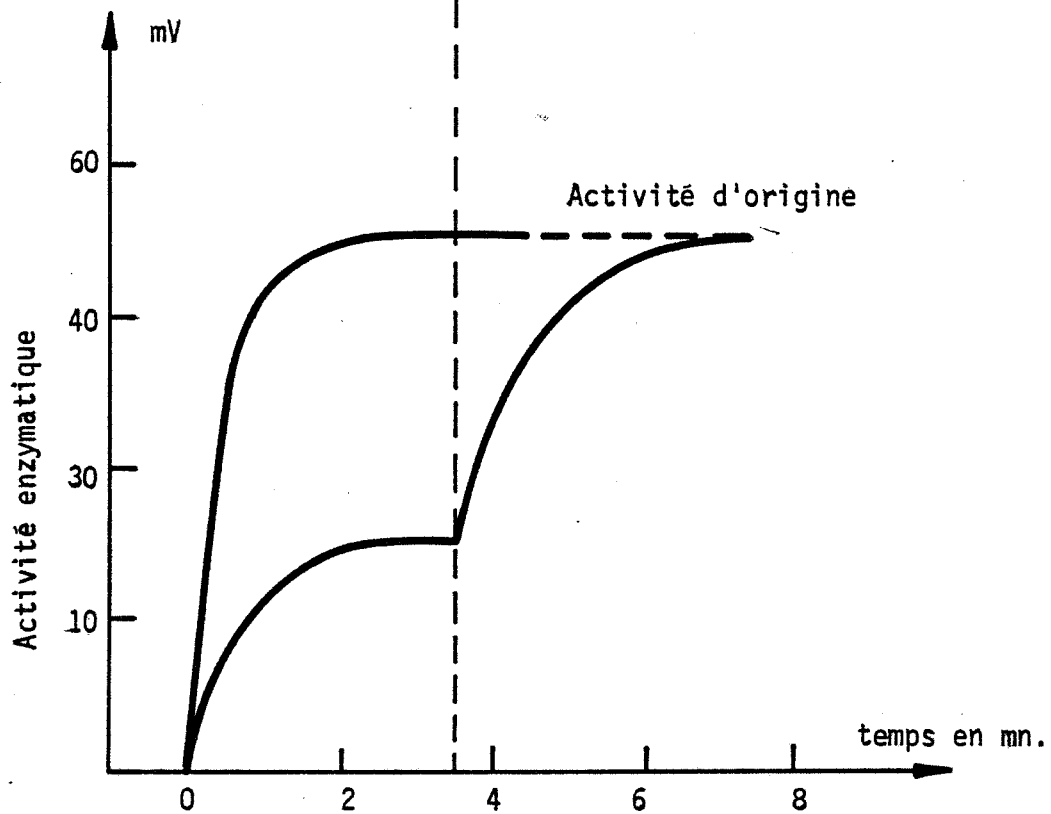


FIG. 36

Régénération par NH_4S d'une électrode d'uréase
inhibée par le mercure

Figure 35 - Désorption du mercure radioactif lors de l'intervention d'une solution de $\text{NH}_4\text{S} \cdot 10^{-4} \text{ M}$ sur une membrane d'uréase inhibée par HgCl_2

Figure 36 - Restitution correspondante de l'activité enzymatique exprimée en mV par l'électrode à uréase.

IV-3-1-2 - Action des ions argent sur l'uréase

L'inhibition de l'uréase en solution par l'argent a été étudiée pour la première fois par SUMMER et MYRBACK ⁽⁷⁰⁾. AMBROSE et KISTIAKOWSKY ^{(71) (72)} ont repris l'étude et ont tenté de calculer le nombre d'ions nécessaires à l'inhibition d'une molécule d'uréase. Leurs résultats ont montré que l'interaction entre l'uréase et l'argent était complexe.

Les conditions expérimentales pour l'étude de l'interaction des ions Ag^+ sur l'uréase immobilisée sont analogues à celles adoptées pour les ions mercuriques. Des solutions d' AgNO_3 marquées au $^{110\text{m}}\text{Ag}$ sont utilisées pour l'inhibition. Comparativement au mercure, la réaction est plus lente et favorisée par l'incubation de l'enzyme en présence des ions Ag^+ (figure 38). Comme pour le cobalt et le mercure on constate que l'argent a un effet inhibiteur très puissant sur l'uréase immobilisée même aux faibles concentrations.

Pour étudier la réversibilité du système uréase-argent, l'une des grandes difficultés d'AMBROSE était de séparer l'enzyme de son milieu réactionnel, étant donné que l'enzyme était utilisée en phase homogène. Notre méthode utilisant une électrode à enzyme greffée a permis de suivre l'activité enzymatique quel que soit le milieu réactionnel avec ou sans inhibiteur.

Une électrode enzymatique dont la membrane d'uréase contient 2,5 UI est mise à incuber pendant dix minutes dans une solution d' AgNO_3 10^{-5}M - $^{110\text{m}}\text{AgNO}_3$ 0,05 μCi . Après lavage on teste l'activité enzymatique et la radioactivité déposées sur l'électrode en fonction du temps (figure 39). On constate sur la figure 39 que la courbe (a) présente trois zones distinctes. Une période AB d'une durée d'environ trois heures où l'activité enzymatique décroît malgré l'absence d'inhibiteur dans la solution. Une zone BC d'environ 4 h 30 pendant laquelle l'activité enzymatique demeure stationnaire, puis une zone CD où l'activité croît progressivement au cours du temps traduisant une régénération lente mais spontanée de la membrane. Au contraire, la courbe (b) montre une décroissance permanente au cours du temps de la quantité d'argent fixée.

Cependant, pour des concentrations d'enzyme élevées au niveau de la membrane l'incubation pendant 10 mn avec des concentrations d'argent faibles conduit aux courbes de la figure 40. Le contrôle de l'activité enzymatique montre que dans la première demi-heure, non seulement il n'y a pas inhibition mais permet

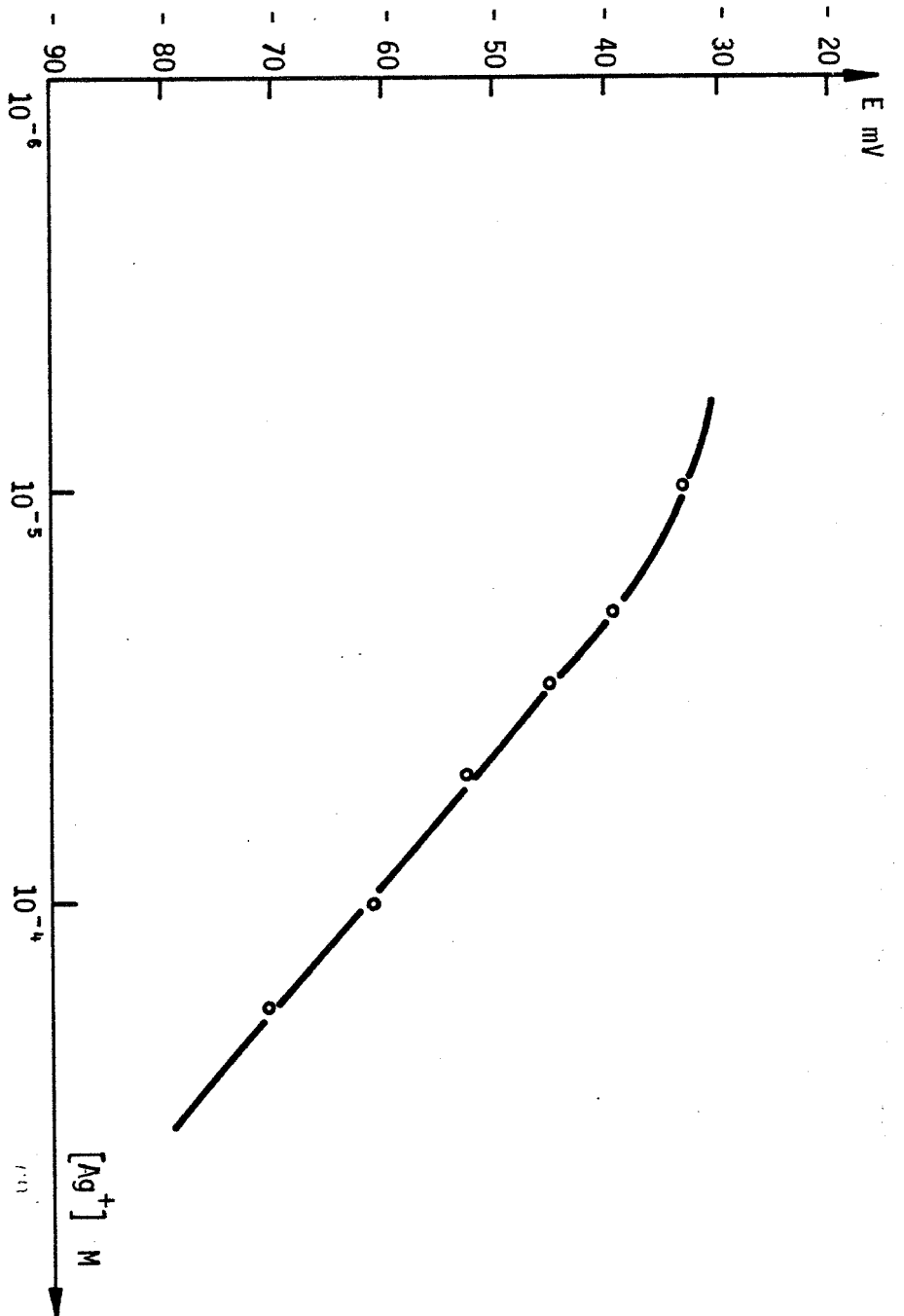
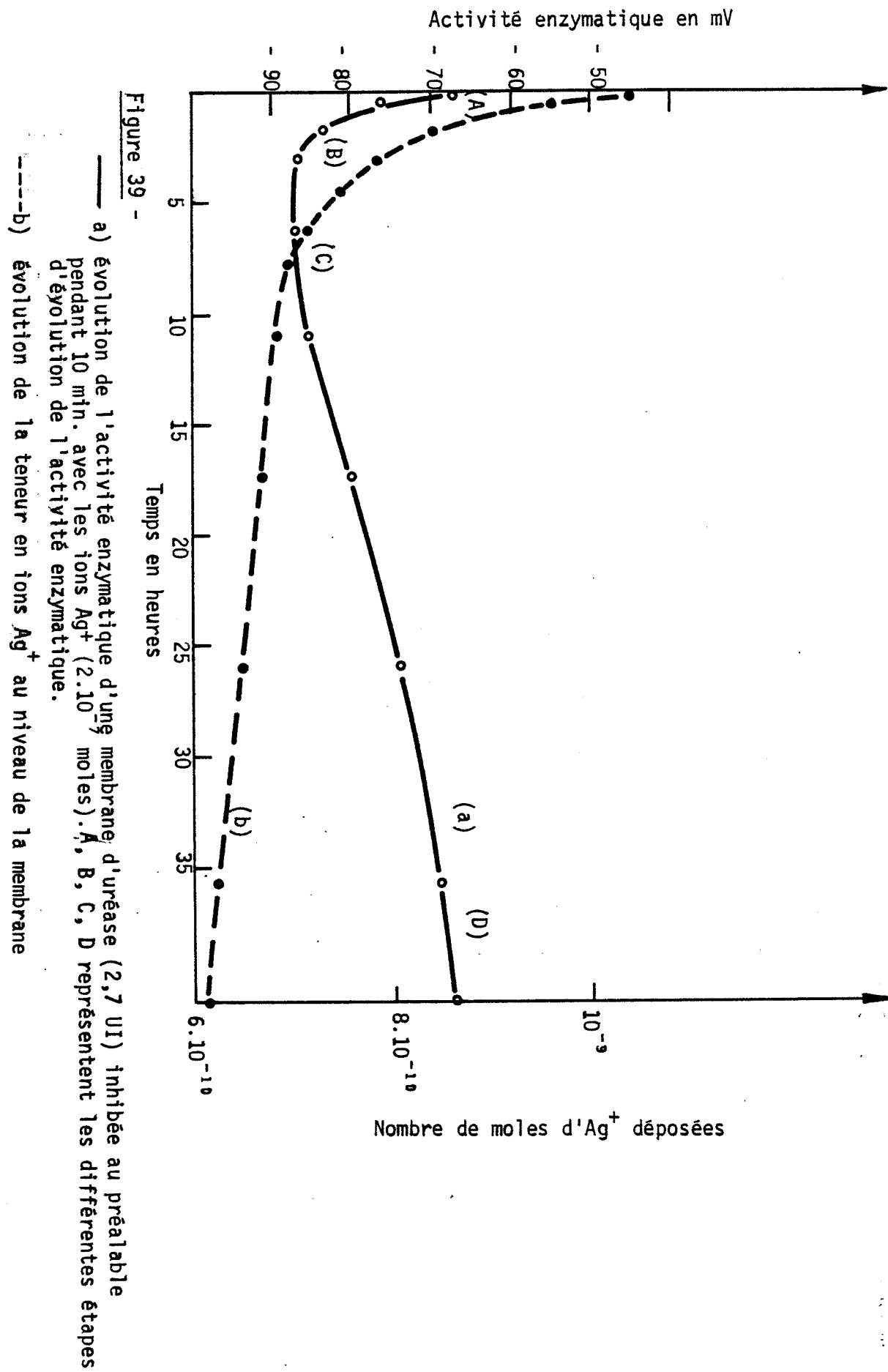


Figure 38 - Réponse de l'électrode à uréase en mV en fonction de la concentration en Ag^+ introduit.
membrane 10,5 UI d'uréase
temps d'incubation 10 minutes



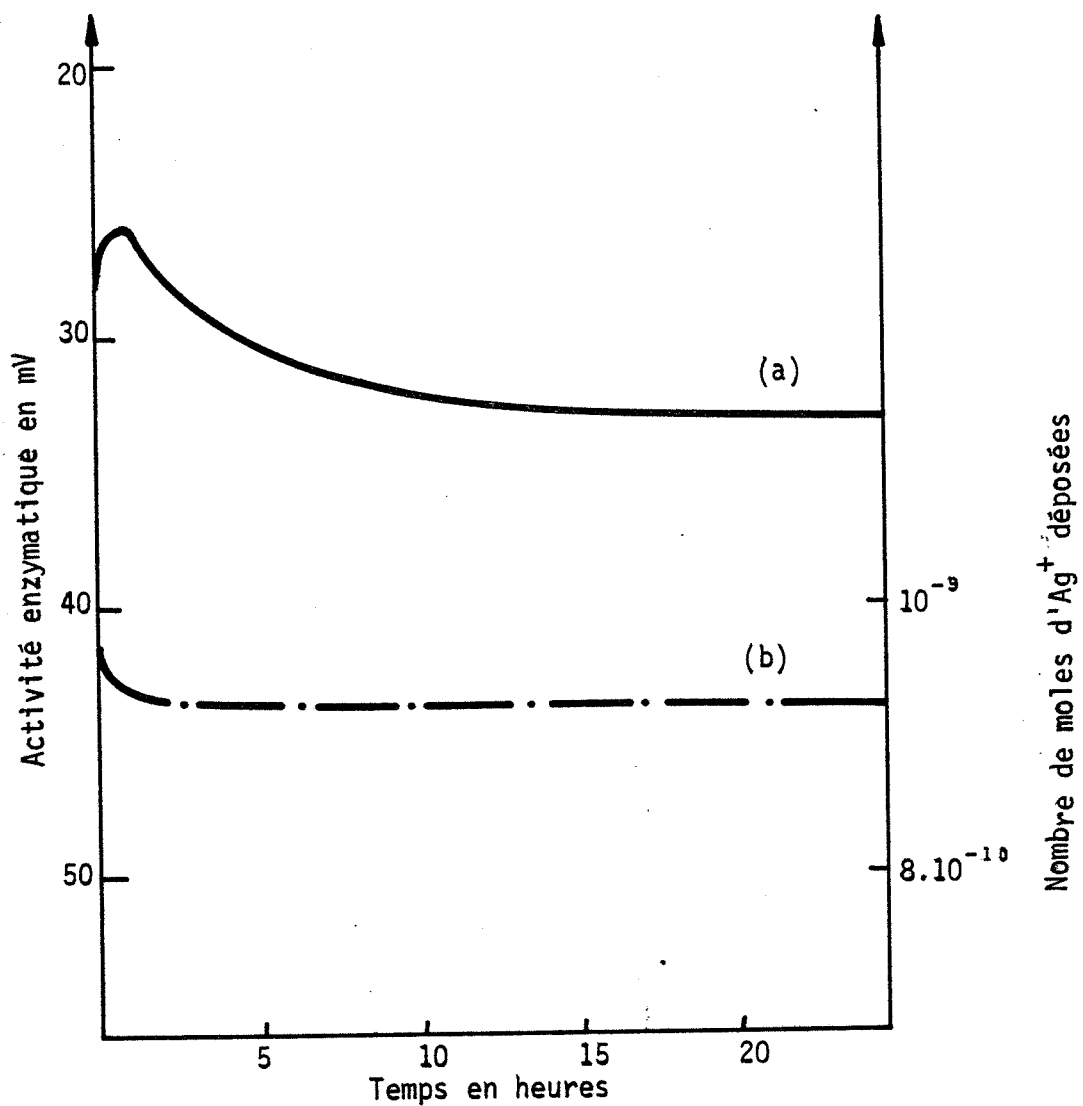
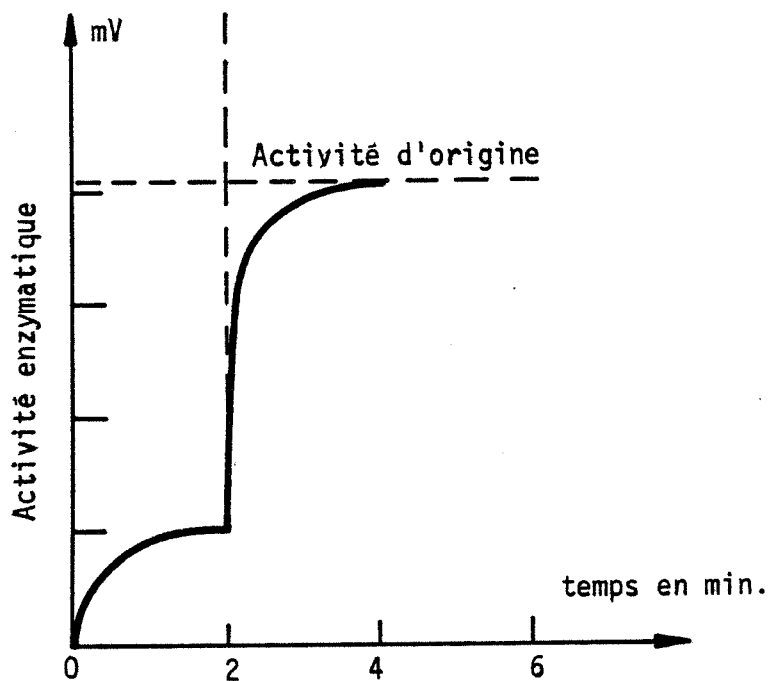
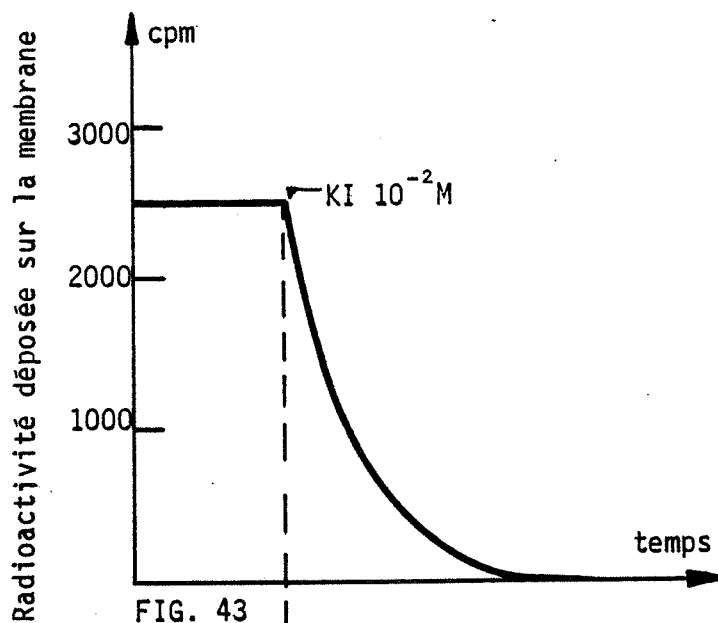


Figure 40 —a) évolution de l'activité enzymatique d'une membrane d'uréase de concentration élevée (15 UI) inhibée au préalable pendant 10 mn avec des ions Ag⁺ (10⁻⁹ moles).

—b) évolution de la teneur en ions Ag⁺ au niveau de la membrane.



Régénération en continu par KI 10⁻²M d'une électrode enzymatique d'uréase inhibée par l'argent.

Figure 43 - Evolution de la radioactivité de la membrane d'uréase en fonction du temps lors du lavage en continu par KI.10⁻²M.

Figure 44 - Evolution de l'activité enzymatique de la membrane en fonction du temps lors du lavage par KI.10⁻²M.

de constater une légère activation. Pour une durée supérieure, l'activité décroît et se stabilise à un niveau constant. La mesure de la radioactivité montre une désorption très faible des ions Ag^+ . Cette anomalie a aussi été observée par COOK (73) et MARQUIS (69).

Malgré l'inhibition réversible de l'uréase par l'argent la régénération de l'enzyme est lente. Nous avons cherché des moyens pour accélérer le processus et régénérer artificiellement l'électrode. Comme pour le mercure, le traitement au sulfure d'ammonium est utilisable compte tenu du produit de solubilité du sulfure d'argent (75). Cependant, le traitement avec l'iodure d'argent est plus spécifique. Les figures 43 et 44 montrent les courbes de régénération en présence de $\text{KI } 10^{-2}\text{M}$ en lavage continu.

IV-3-1-3 - Fixation des ions métalliques en fonction du pH

On pense que l'action des métaux sur les enzymes se ferait au niveau des groupements thiols qu'ils participent ou non au site actif (1). Or la réaction des ions métalliques avec les groupements thiols dépend du pH en relation avec la dissociation du groupement SH. Dans la plupart des cas la vitesse et l'importance de la réaction augmente avec l'élévation du pH.

La figure 45 représente la fixation, en fonction du pH, du cobalt radioactif sur des membranes uréases réticulées après une heure d'incubation dans des solutions de $^{57}\text{CoCl}_2 \ 10^{-3}\text{M}$. Le pourcentage de Co^{2+} fixé augmente avec le pH.

Inversement, on constate une désorption plus importante du cobalt pour les pH acides (figure 46), lorsque la membrane enzymatique est lavée par des solutions tampons.

Nous disposons donc d'un moyen permettant de favoriser la régénération de la membrane, en lavant cette dernière dans un tampon relativement acide afin de déplacer l'équilibre vers la formation de $\text{E} - \text{SH}$, sans toutefois dénaturer l'enzyme.

Inversement, dans le cas d'un dosage des ions métalliques avec une électrode enzymatique on aura intérêt à faire incuber la membrane enzymatique avec l'ion en question dans un tampon basique afin d'améliorer la limite de détection.

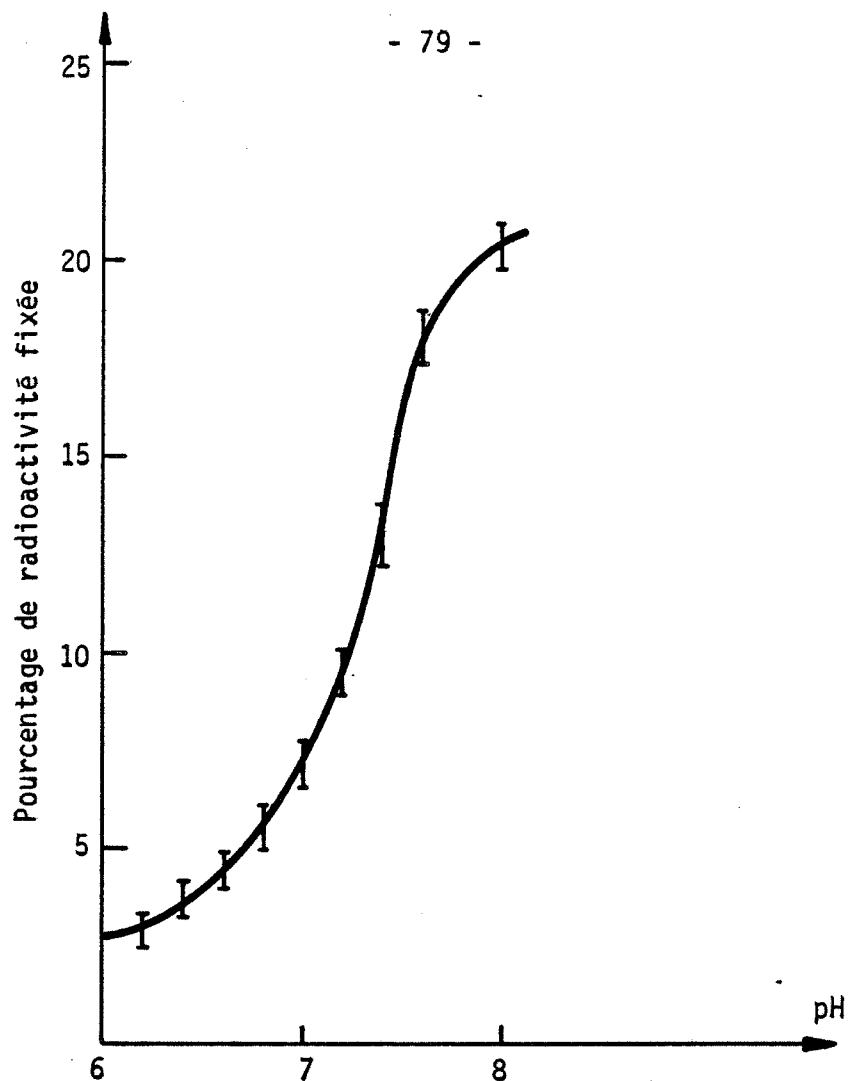


Figure 45 - Fixation du cobalt sur une membrane d'uréase en fonction du pH.

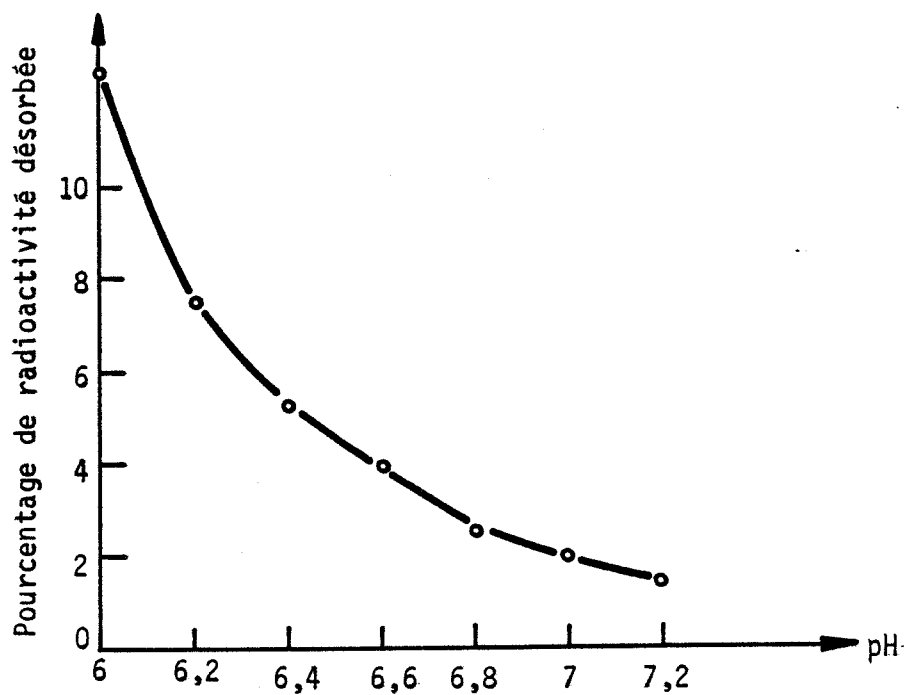


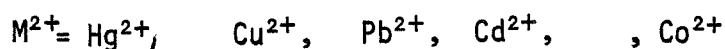
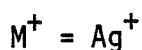
Figure 46 - Désorption du cobalt fixé sur une membrane d'uréase en fonction du pH des solutions tampon de lavage.

IV-3-1-4 - Inhibition de la cholinestérase par les ions métalliques

L'action des ions métalliques sur les groupements SH formerait des mercaptides selon les réactions suivantes :



avec :



On voit donc qu'il y a libération d'ion H^+ lors de la réaction avec l'ion métallique. Ce phénomène peut être suivi avec une membrane de cholinestérase fixée à l'électrode verre lorsqu'on fait réagir une solution de $CoCl_2$ tamponnée au pH de la solution de départ (figure 47). Grâce à la mesure très localisée du microenvironnement créé par la membrane on constate lors de l'introduction de $CoCl_2$ une diminution du pH qui caractérise la libération des ions H^+ . Les essais sur les membranes d'AChE ont montré que le cobalt et l'argent ne sont pas inhibiteurs de cette enzyme même aux très fortes concentrations ($10^{-3}M$), et une incubation de longue durée. Au contraire on constate une activation sensible de l'enzyme par le cobalt comme le montre la figure 47 où l'on voit la réponse de l'électrode à l'acétylcholine $10^{-2}M$ avant et après traitement au $CoCl_2$ $10^{-3}M$ et lavage abondant de la membrane. Les mesures de radioactivité montrent une faible fixation du cobalt au niveau de la membrane enzymatique, cette fixation diminue notablement après introduction de l'acétylcholine. Si le phénomène d'activation est difficilement explicable, on peut considérer que des groupements SH ne participent pas au site actif. De plus, compte tenu de l'étude précédente sur la fixation des ions métalliques en fonction du pH on peut considérer que le propre produit de la réaction (l'acide acétique) fait relarguer l'inhibiteur par abaissement du pH local.

Quant au mercure, il donne lieu à une inhibition irréversible de l'AChE en accord avec les résultats de GOLDSTEIN et DOHERTY (68).

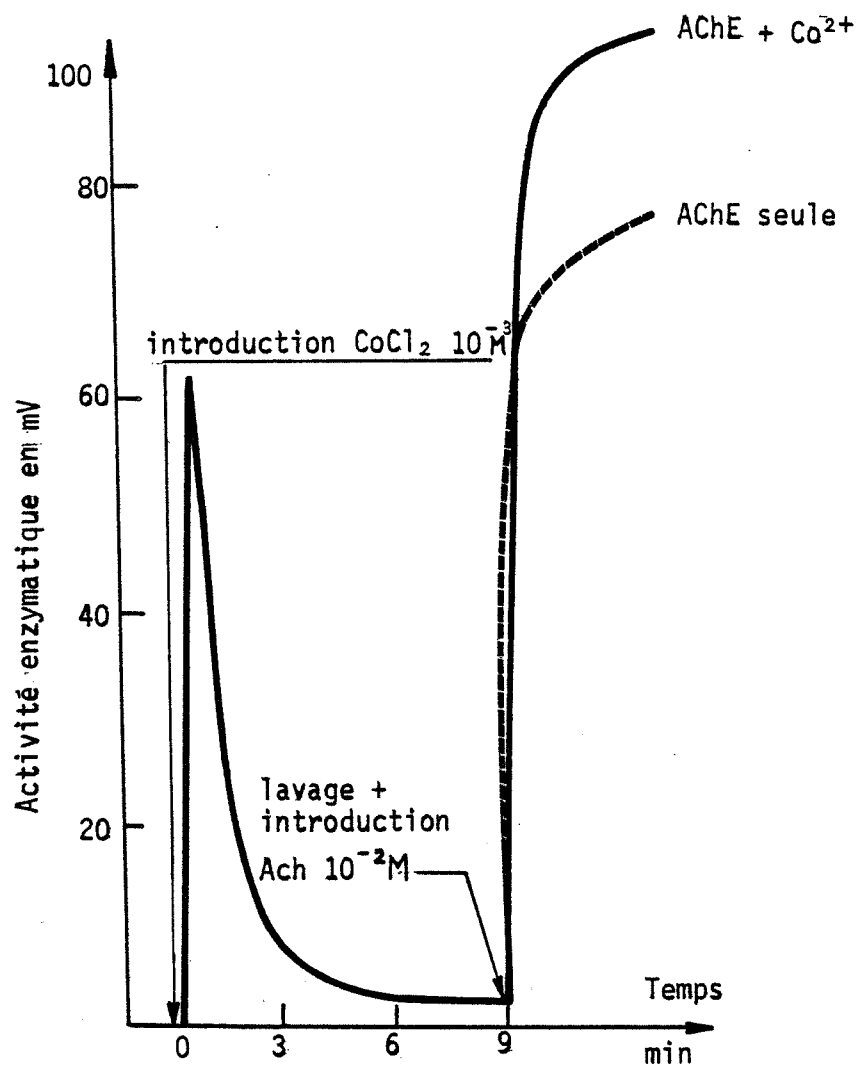


Figure 47 - Réponse d'une électrode d'AChE
à l'acétylcholine 10^{-2}M soumise à
une solution de CoCl_2 10^{-3}M pH = 7,4

— On constate : la libération des ions H^+ au niveau de la membrane lors de l'introduction de la solution tamponnée de CoCl_2 , puis après retour à l'équilibre et un lavage abondant de la membrane, une réaction enzymatique activée avec l'acétylcholine 10^{-2}M .

---- Comparaison avec la réponse de l'électrode à AChE pour l'acétylcholine 10^{-2}M n'ayant pas été soumise à CoCl_2 .

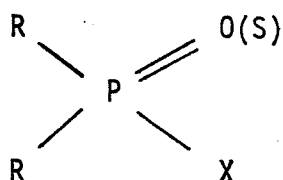
CONCLUSION

Bien que les ions métalliques puissent se fixer sur les deux enzymes étudiées, l'uréase et l'AChE, leur action est fondamentalement différente. Cela montre que la nature de leur centre actif est différente et que la participation des groupements SH dans le cas de l'uréase est essentielle à l'activité catalytique contrairement à l'AChE.

IV-3-2 - ACTION DES ORGANOPHOSPHORES

Des intoxications aiguës très fréquentes et des plus graves sont le fait des composés organophosphorés, esters de l'acide phosphorique ou de ses dérivés, fruits des recherches de la dernière guerre mondiale pour les gaz de combat, et qui entrent maintenant dans la composition de la plupart des pesticides et des insecticides. Grâce à leur solubilité dans les graisses, ils pénètrent facilement dans l'organisme et sont connus pour inhiber irréversiblement les cholinestérases (76) (77) (78) (79) (80).

Les plus redoutables sont : Tabun , Sarin, Malathion, Parathion, Paraoxon ... certains sont connus par leurs abréviations comme le DIFP, DFP, TEPP, ils sont tous basés sur la même structure :



Certains sont volatils comme le Tabun et le Sarin, la plupart des autres sont très peu solubles dans l'eau, le paraoxon est soluble à 2 % à l'état pur. Nous avons donc choisi ce produit pour représenter le groupe.

IV-3-2-1 - Etude de la cinétique d'inhibition de l'AChE immobilisée

La vitesse d'inhibition de l'AChE immobilisée a été déterminée en utilisant l'électrode enzymatique incubant dans des solutions de paraoxon pendant des temps variables. Au temps choisi l'addition d'une solution d'acétylcholine 10^{-2}M permet de mesurer l'activité enzymatique résiduelle.

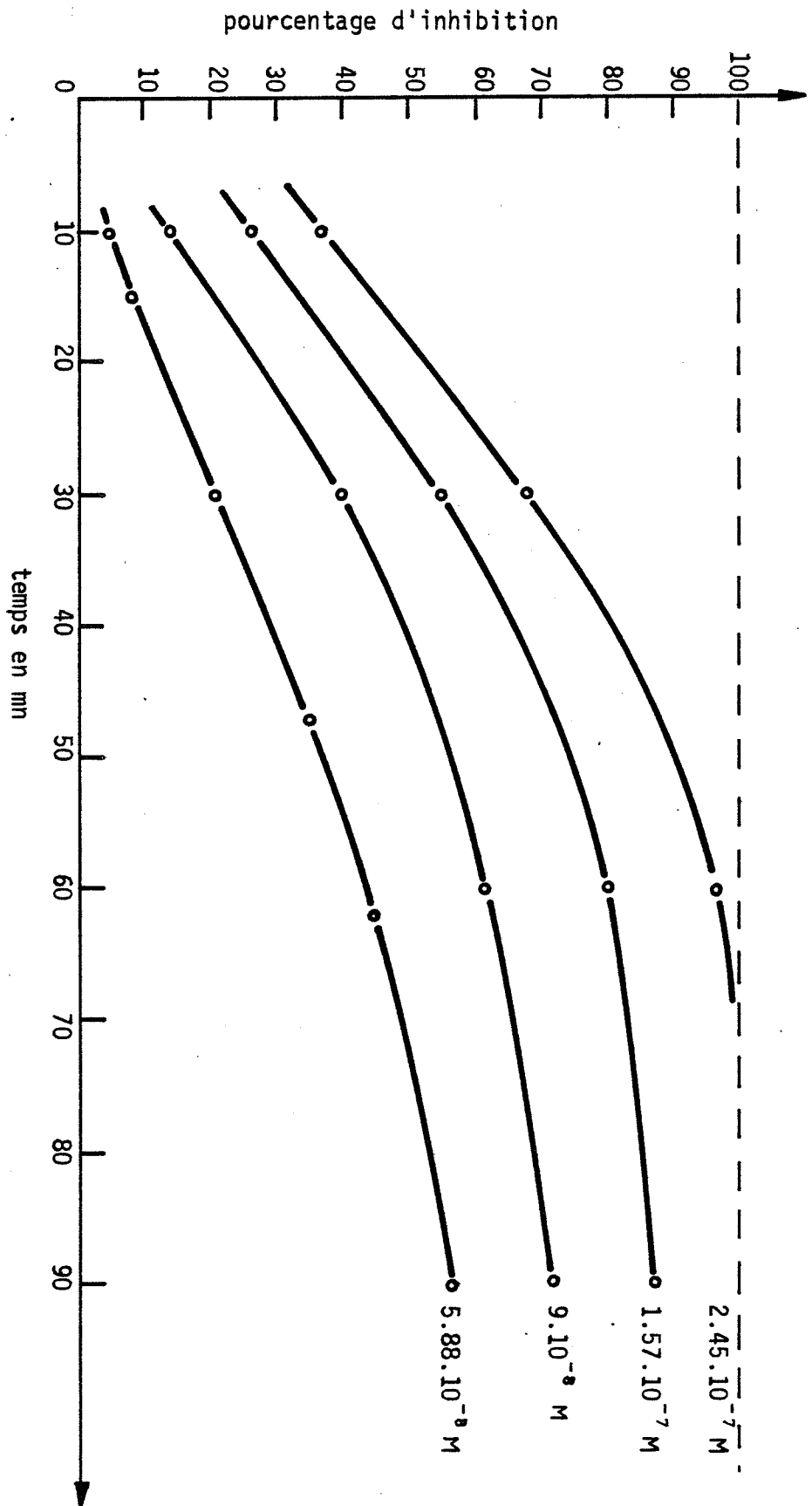


Figure 48 - Evolution du pourcentage d'inhibition de l'AChE en fonction du temps pour différentes concentrations en paraoxon

- membrane d'AChE de 2,5 unités
- temps de réticulation 20 minutes
- tampon phosphate 0,01 M pH = 7,4
- température 25°C
- réaction avec acétylcholine 10^{-2} M

Les résultats de ces expériences sont montrés dans la figure 48 où l'évolution de l'inhibition est exprimée en pourcentage d'inhibition, pour différentes concentrations en paraoxon. La représentation correspondante en coordonnées semi-logarithmiques donne des droites indiquant que la réaction est du premier ordre pour une concentration donnée en inhibiteurs :



$$- \frac{d[E]}{dt} = k_{+1}[E][I] - k_{-1}[EI] \quad (2)$$

Etant donné que la réaction est fortement déplacée vers la droite :

$$k_{-1}[EI] \approx 0 \quad (3)$$

On a à $[I]$ donné ($I = \text{Cte}$)

$$- \frac{d[E]}{[E]} = k_{+1}[I] dt \quad (4)$$

$$\ln \frac{[E_0]}{[E]} = k_{+1}[I] t \quad (5)$$

Comme l'activité enzymatique A est proportionnelle à la concentration en enzyme :

$$\ln \frac{[E_0]}{[E]} = \ln \frac{A_0}{A} = k_{+1}[I] t \quad (6)$$

La pente des droites obtenues dans la figure (49) donne :

$$k_{+1} = 7,7 \cdot 10^4 \text{ l.mole}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

Pour comparer l'effet d'inhibition des différentes substances la plupart des auteurs utilisent l'expression I_{50} (définie au paragraphe VI-2) qui ne fait pas intervenir le temps d'incubation. Aussi est-il difficile souvent de comparer les résultats de la littérature.

L'expression de k_{+1} que nous avons introduit ci-dessus est une constante plus satisfaisante pour caractériser les inhibiteurs irréversibles. L'inhibition à n'importe quelle concentration et n'importe quel temps d'incubation peut être facilement calculée à partir de k_{+1} . Comme le montre la figure 50 on peut tracer théoriquement la courbe de réponse de l'électrode en fonction des concentrations en paraoxon pour un temps d'incubation avec l'inhibiteur.

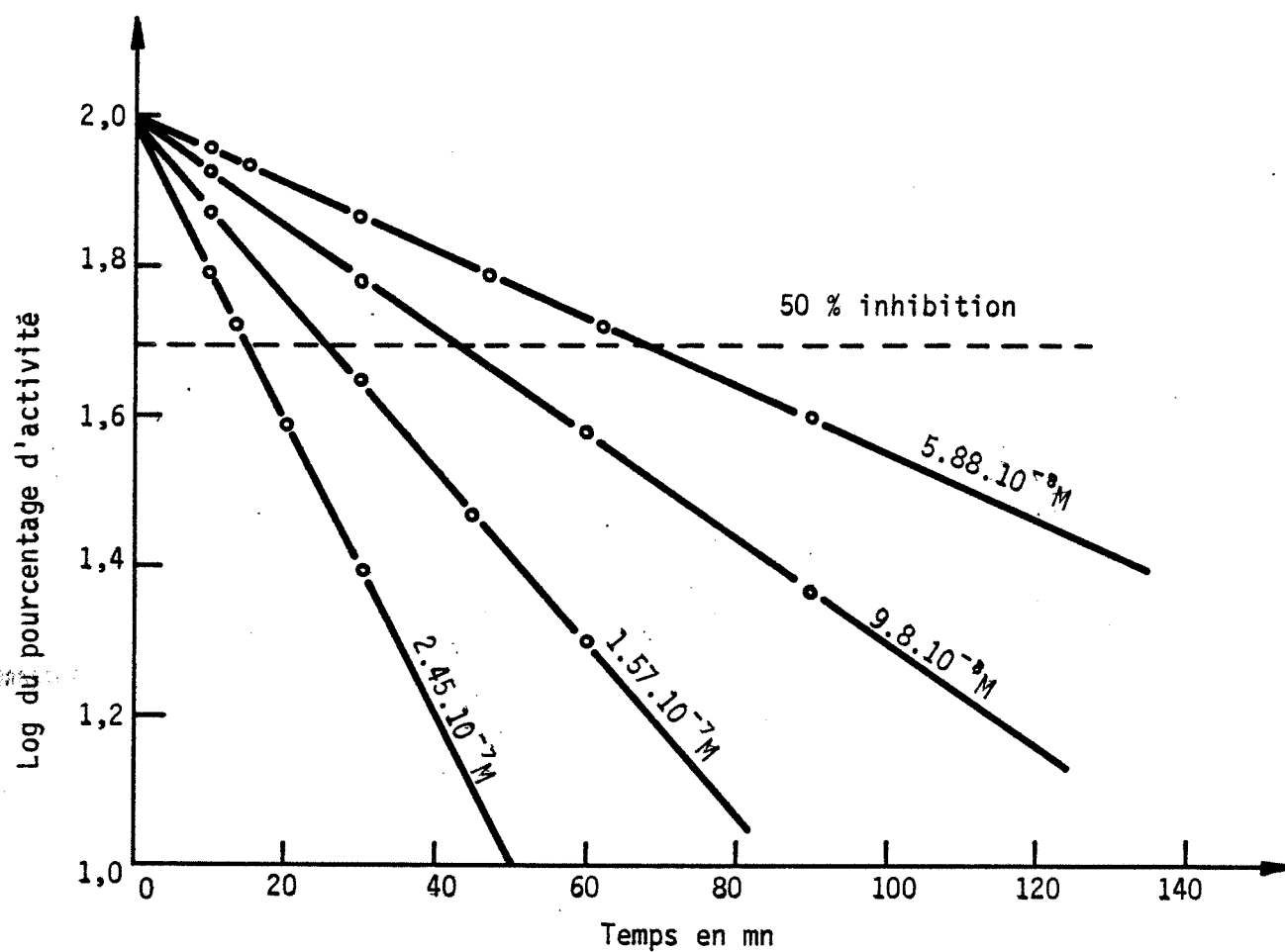


Figure 49 - Inhibition de la cholinestérase en fonction de la concentration de paraoxon.

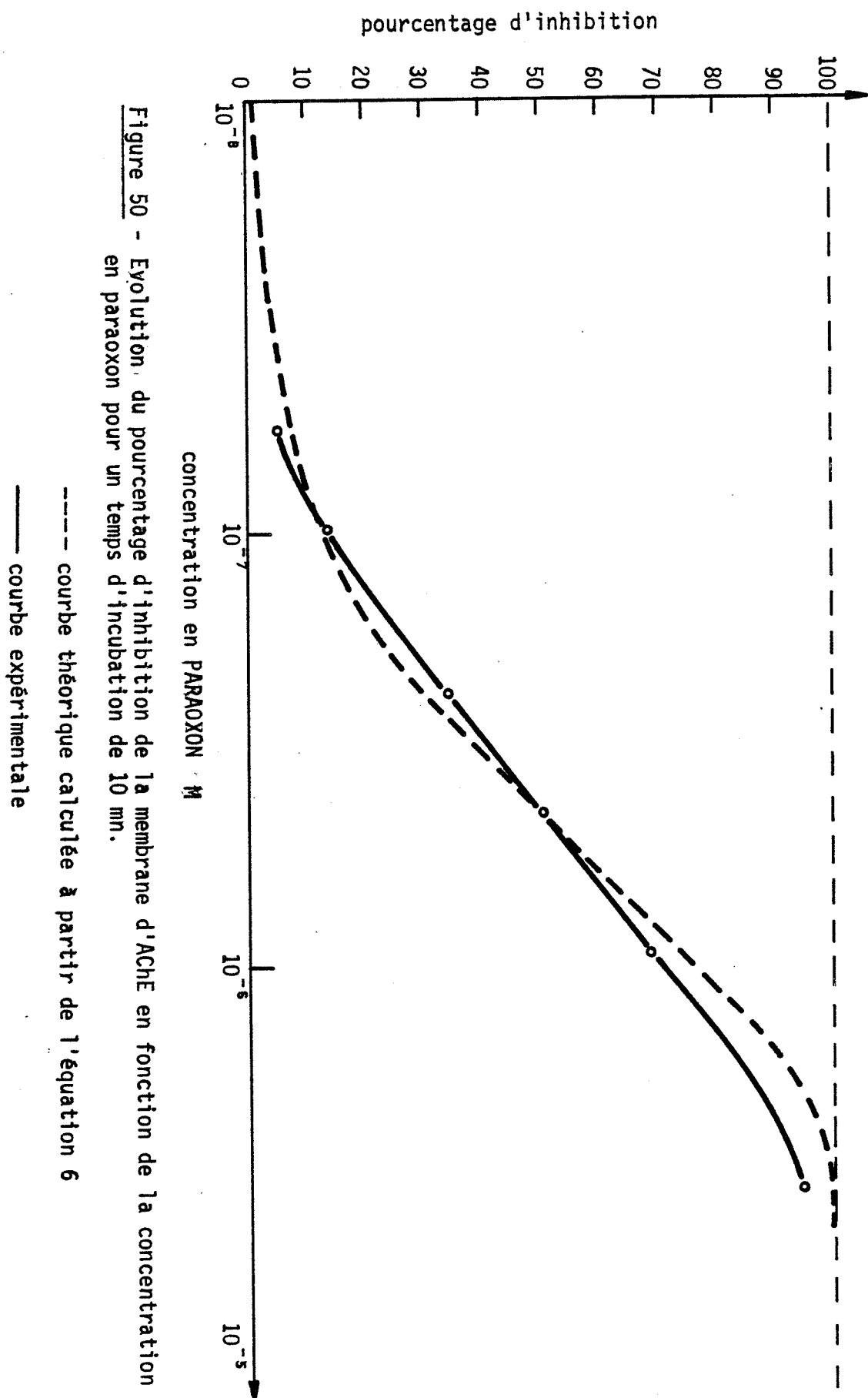
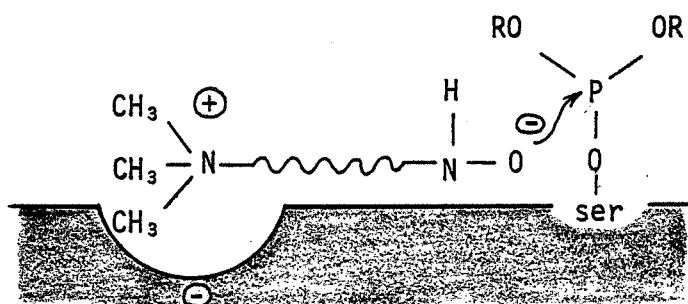


Figure 50 - Evolution du pourcentage d'inhibition de la membrane d'AChE en fonction de la concentration en paraoxon pour un temps d'incubation de 10 mn.

IV-3-2-2 - Réactivation artificielle de la membrane inhibée

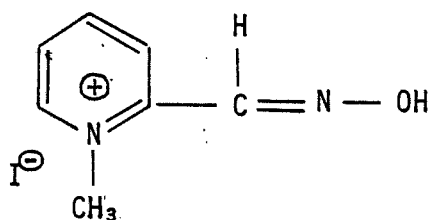
On a expliqué l'action des alcoylphosphates par l'attaque nucléophile de l'enzyme sur l'atome de phosphore ⁽⁸¹⁾. Après cette phosphorylation, la régénération spontanée de l'enzyme est lente et nécessite une intervention extérieure au moyen d'un antidote efficace.

On peut lever l'inhibition en attaquant l'atome de phosphore à l'aide d'un agent plus nucléophile qui le détache de l'enzyme. Le point de départ dans le développement d'un antidote est dû à Irwin WILSON ⁽⁸²⁾ qui trouva que l'hydroxylamine relarguait le groupe phosphorylé attaché au fragment sérine. La difficulté était d'en faire une réaction utilisable en thérapeutique. L'hydroxylamine ne peut être utilisée in-vivo parce qu'elle est toxique à haute concentration nécessaire pour réactiver l'AChE inhibée. Comme l'enzyme a un site anionique pour la charge positive de l'acétylcholine il est plus judicieux d'utiliser un dérivé de l'hydroxylamine permettant l'attaque nucléophile et possédant une charge positive comme un groupement ammonium, quaternaire qui oriente les groupements complémentaires et facilite l'attaque de l'enzyme en augmentant la spécificité.



Réactivation artificielle de l'AChE au moyen de dérivé de l'hydroxylamine

De nombreux composés contenant un groupe ammonium quaternaire et une fonction hydroxylamine ont été testés comme réactivateurs ⁽⁸³⁾. Le plus efficace d'entre eux est l'iodure de méthyl-pyridine aldoxime (PAM) ⁽⁸⁴⁾.



formule de la PAM

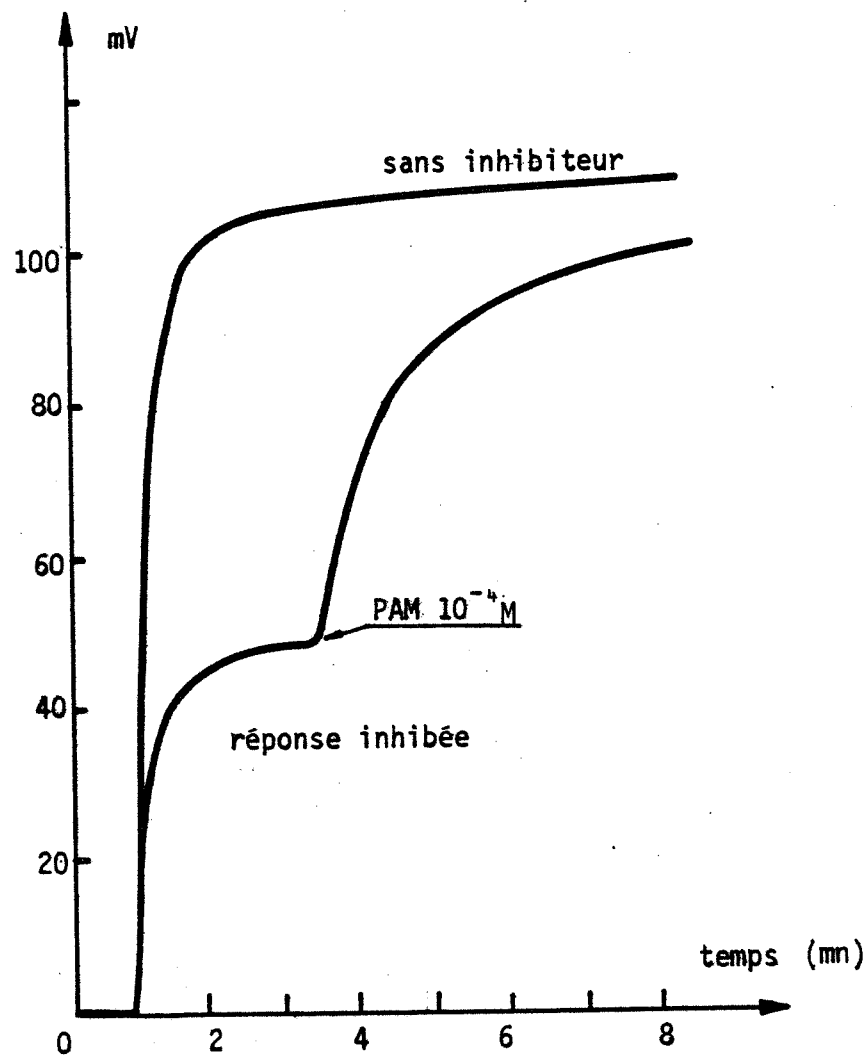


Figure 51 - Evolution du signal d'une électrode d'AChE fraîchement inhibée par du paraoxon 10^{-7} M lors de l'injection dans le milieu d'une solution de PAM 10^{-4} à pH = 7,4

CHILDS et coll. ont étudié la réaction de la PAM avec le sarin puis son emploi comme antidote chez le rat ⁽⁸⁵⁾.

Comme le montre la figure 51 représentant l'évolution du signal délivré par une électrode d'AChE fraîchement inhibée par du paraoxon, l'injection de PAM dans le milieu d'acétylcholine provoque immédiatement une restitution de l'activité enzymatique.

Cinétique de réactivation par la PAM de l'AChE immobilisée

DAVIES ⁽⁸⁶⁾ a proposé une cinétique de réactivation par divers agents de l'AChE des érythrocytes en solution inhibée par la Sarin et le TEPP, sans séparer l'enzyme des réactifs. Or lorsqu'on compare la réponse d'une électrode d'AChE dans une solution d'acétylcholine en présence et en l'absence de PAM 10^{-4} M dans un tampon phosphate pH 7,4 (figure 52), on voit que la PAM a non seulement une action sur les organophosphorés ⁽⁸⁷⁾ mais aussi un pouvoir activateur sur l'enzyme. Cette activation de l'AChE en solution par la PAM et les cations aromatiques en général a été confirmée récemment par BARNETT et ROSENBERRY ⁽⁸⁸⁾ ainsi que WILSON et SILMAN ⁽⁸⁹⁾ et mériterait une étude approfondie en phase hétérogène. Bien que l'on ne connaisse pas le mécanisme exact de l'action activatrice de la PAM sur l'enzyme on voit que si l'on maintient présent le réactivant lors de la mesure de l'activité on aura une surestimation de l'activité réelle de l'enzyme régénérée. En phase hétérogène cet inconvénient peut être levé en lavant la membrane enzymatique après régénération.

Afin d'associer l'augmentation relative de l'activité enzymatique au départ de l'inhibiteur provoqué par l'action de la PAM, nous avons étudié la cinétique de régénération de la membrane d'AChE inhibée au préalable par du paraoxon marqué au ^{32}p en couplant les mesures délivrées par l'électrode enzymatique et la radioactivité restante au niveau de la membrane après action de la PAM en utilisant le dispositif expérimental décrit au paragraphe III-3-1-2 exploitant l'effet Cerenkov.

Un corps d'électrode d'AChE est mis à incuber pendant cinq minutes dans une solution de paraoxon 2.10^{-6} M marquée au ^{32}p dans du tampon (tampon phosphate

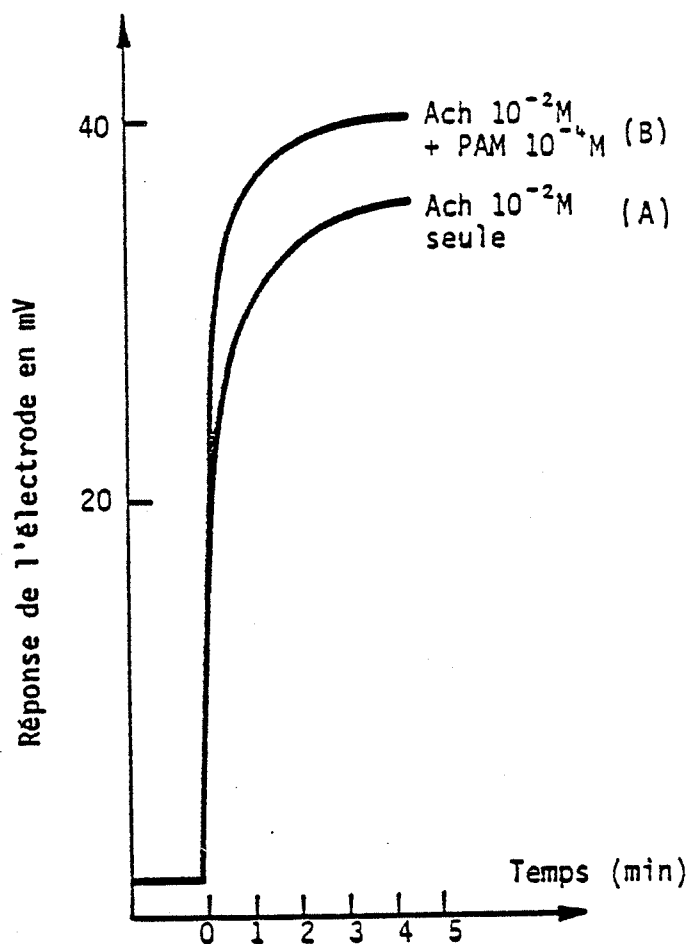


Figure 52 -Effet activateur de la PAM sur l'hydrolyse de l'acétylcholine catalysée par l'AChE

évolution de la réponse de l'électrode à AChE en fonction du temps :

courbe(A): avec l'acétylcholine seule 10⁻²M

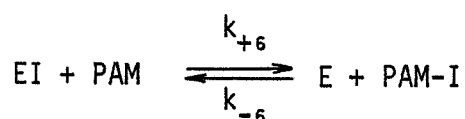
courbe(B): acétylcholine 10⁻²M + PAM 10⁻⁴M.

0,01M + NaCl 9%). L'électrode est ensuite abondamment lavée pour extraire l'excès d'inhibiteur et l'activité résiduelle est mesurée. On immerge la tête de l'électrode dans une solution de PAM 10^{-4} M dans le même tampon phosphate pendant des temps variables afin de régénérer l'enzyme. Au temps désiré, l'électrode est lavée pour enlever l'excès de PAM, et l'activité enzymatique est testée avec une solution d'acétylcholine 10^{-2} M et la radioactivité est mesurée.

On suit la régénération de l'électrode en fonction du temps de contact du réactivant. Après chaque expérience l'électrode est rincée à nouveau dans une solution de PAM 10^{-2} M pendant trente minutes afin de régénérer totalement l'électrode et pouvoir recommencer une nouvelle expérience.

La figure 53 donne la réponse de l'électrode exprimée en pourcentage d'activité en fonction du temps et parallèlement la radioactivité de la membrane pour une concentration de PAM 10^{-4} M. On constate que pour une concentration de 10^{-4} M de PAM la régénération est totale au bout de trente minutes.

Si le processus de réactivation consiste en un déplacement nucléophile direct de l'atome de phosphore porté par l'enzyme, on a la réaction suivante :



La vitesse de réaction s'écrit alors :

$$v = \frac{dE}{dt} = k_{+6} [EI] \cdot [PAM] - k_{-6} [E] \cdot [PAM-I]$$

En supposant que la vitesse de la réaction dans le sens droite-gauche soit négligeable (PAM-I dilué en continu) devant la vitesse de régénération de l'enzyme, on a l'équation suivante :

$$\frac{d[E]}{dt} = k_{+6} ([EI]_0 - [E]) \cdot [PAM]$$

avec :

$[EI]_0$ concentration totale d'enzyme inhibée pouvant subir la réactivation

$[E]$ concentration de l'enzyme réactivée après le temps t

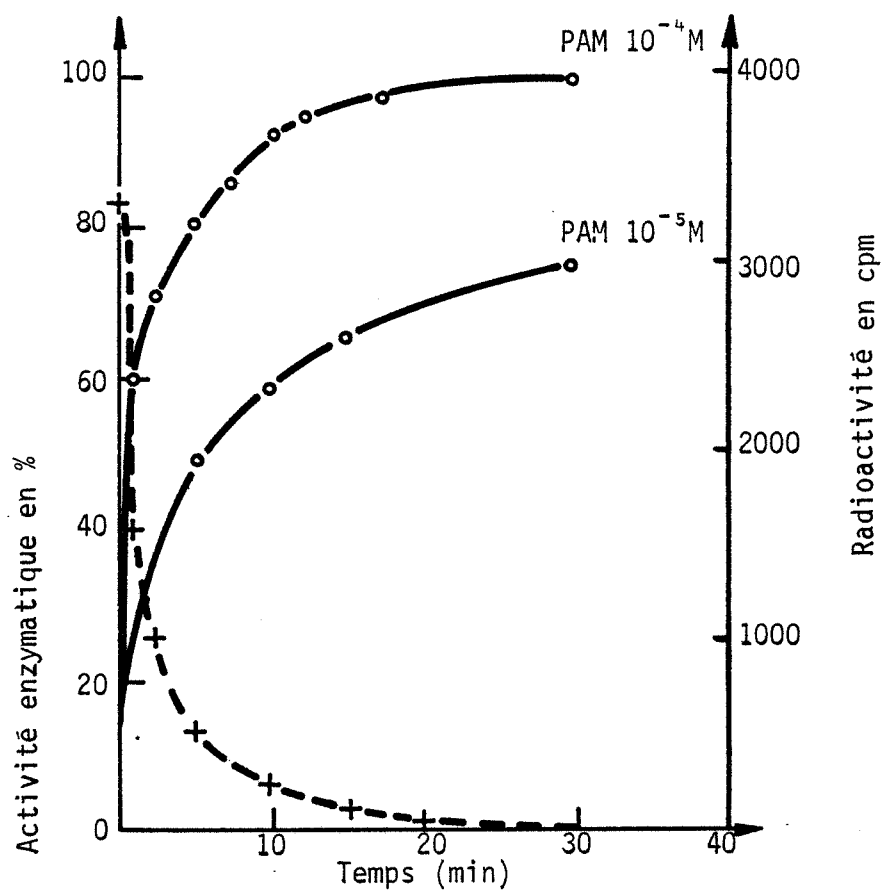


Figure 53 - Régénération de la membrane d'AChE inhibée au paraoxon pendant 5 min. par des solutions de PAM à pH = 7,40 et à 25°C.

- Evolution du pourcentage d'activité enzymatique de la membrane en fonction du temps.
- Evolution de la radioactivité comptée dans la membrane en fonction du temps lors de l'intervention d'une solution de PAM $10^{-4}M$.

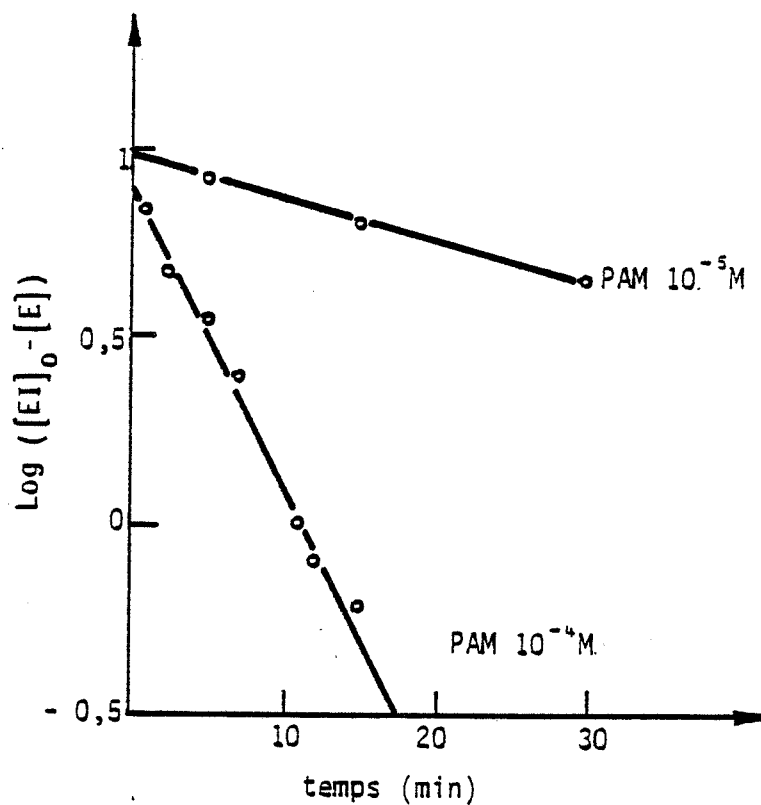


Figure 54 - Variation de $\log ([EI]_0 - [E])$ en fonction du temps pour deux concentrations de PAM (10^{-4} et 10^{-5} M).

avec $[EI]_0$: concentration totale d'enzyme inhibée

$[E]$: concentration d'enzyme réactivée au temps t.

Cette hypothèse sera valable à condition que :

a) L'enzyme ne contient pas deux ou plusieurs formes qui puissent être réactivées à des vitesses différentes. Nous verrons plus loin que cette hypothèse peut être justifiée dans les conditions de l'expérience (temps d'incubation avec l'organophosphoré est court) mais devient fausse si le séjour avec l'inhibiteur se prolonge.

b) Le pH et la température sont maintenus constants.

c) La PAM ne forme pas un complexe avec l'enzyme inhibée.

Si l'on considère que la PAM est en excès par rapport à l'enzyme inhibée, la figure (54) montre une expression linéaire du $\log ([EI_0 - E])$ en fonction du temps selon une cinétique du premier ordre apparent.

Les droites tracées suivant la méthode des moindres carrés permettent de déterminer la valeur de la constante $k_{+6} = 8.10^2 \text{ l.mole}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Influence du temps de repos après incubation

On a observé que si l'électrode d'AChE fraîchement inhibée par le para-oxon et lavée pour être débarrassée de l'excès était stockée à la température ambiante pendant plusieurs heures il n'était plus possible de restaurer totalement l'activité initiale malgré un traitement à la PAM à forte concentration. FLEISHER et coll. ⁽⁹⁰⁾ précisent dans une étude sur des rats empoisonnés par des composés organophosphorés que la survie dépend du temps où le réactivateur est administré, une heure après l'empoisonnement le taux de survie tombe à moins de 10 %.

On peut alors formuler deux hypothèses à la suite de l'intervention du réactivant :

a) le contact prolongé de l'organophosphoré et de l'enzyme engendre des modifications profondes de la structure, l'enzyme devenant labile. L'intervention de la PAM bien que débarrassant l'enzyme de l'inhibiteur ne peut régénérer la molécule active.

b) l'enzyme inhibée par le paraoxon évolue vers un complexe plus stable et la PAM ne peut débarrasser entièrement l'enzyme de l'inhibiteur. Une étude en utilisant un inhibiteur marqué peut trancher.

Ce phénomène a été étudié sur des membranes identiques d'AChE inhibée par du paraoxon $^{32}\text{P } 10^{-6}\text{M}$ pendant cinq minutes. Après lavage pour enlever l'excès de paraoxon elles étaient stockées à température ambiante, puis réactivées les unes après les autres toutes les heures avec de la PAM 10^{-4}M à $\text{pH} = 7,4$ pendant trente minutes. Les résultats sont montrés dans le tableau I où le pourcentage de la radioactivité sur la membrane est défini comme étant égal à :

$$\frac{\text{radioactivité après régénération}}{\text{radioactivité totale après inhibition}} \times 100$$

	Temps de repos après incubation en heures					
	0	1	2	3	4	5
Pourcentage de radioactivité sur la membrane	≈ 0	1,7	2,8	5	7,9	12,8

Si la membrane traitée immédiatement après inhibition est entièrement régénérée, les suivantes ne le sont pas et fixent l'inhibiteur en concentration croissante.

Par contre, une électrode d'AChE fraîchement inhibée par du paraoxon et conservée pendant une semaine au réfrigérateur garde sa faculté d'être réactivée par la PAM.

En conclusion :

- l'enzyme inhibée évolue vers un complexe plus stable qui ne peut être ensuite régénéré par les agents nucléophiles. Cette évolution est relativement lente, et dépend de la température.
- la cinétique de régénération n'est valable que dans les premiers instants qui suivent l'inhibition.

On voit l'intérêt d'utiliser les enzymes fixées par rapport aux enzymes en solution.

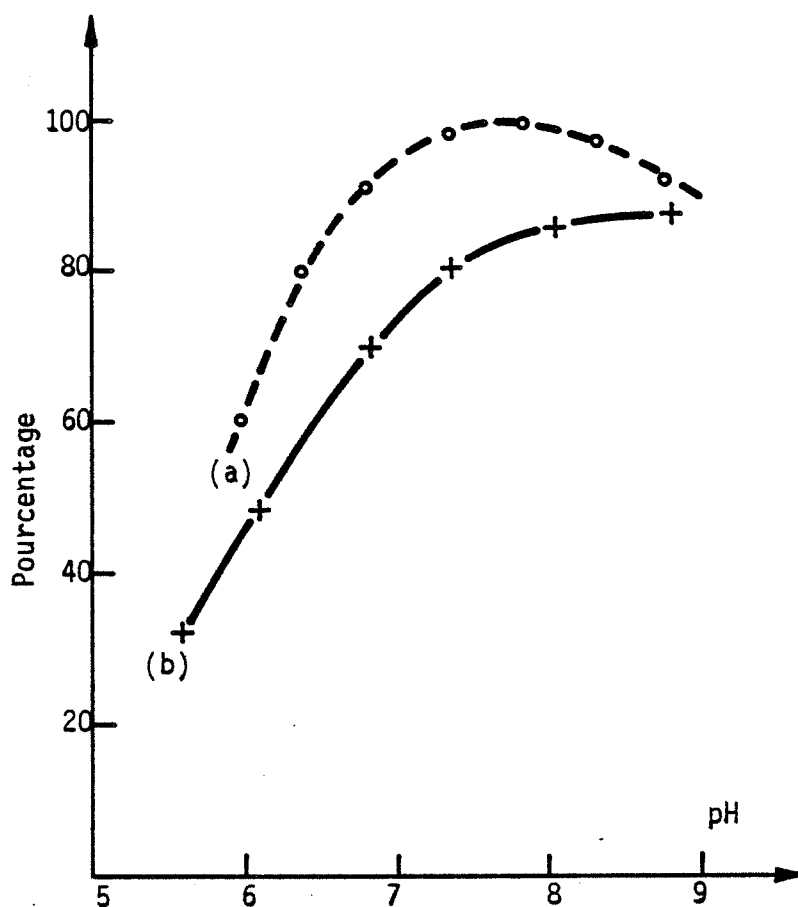


Figure 55 - Comparaison du pourcentage d'inhibition et du pourcentage de régénération en fonction du pH

courbe (a) : pourcentage d'inhibition de la membrane par le paraoxon 10^{-6} M en fonction du pH pour un temps d'incubation 5 min.

courbe (b) : pourcentage de régénération en fonction du pH de la membrane inhibée pendant 5 min. avec une solution de paraoxon 10^{-6} pendant 5 min. à pH = 7,4 traitée pendant 5 min. avec PAM 10^{-4}

IV-3-2-3 - Influence du pH

Le pH du milieu réactionnel a une influence importante lors de l'inhibition ou de la régénération de la membrane enzymatique.

La figure (55) permet de comparer l'inhibition et la régénération de la membrane de cholinestérase en fonction du pH du milieu réactionnel.

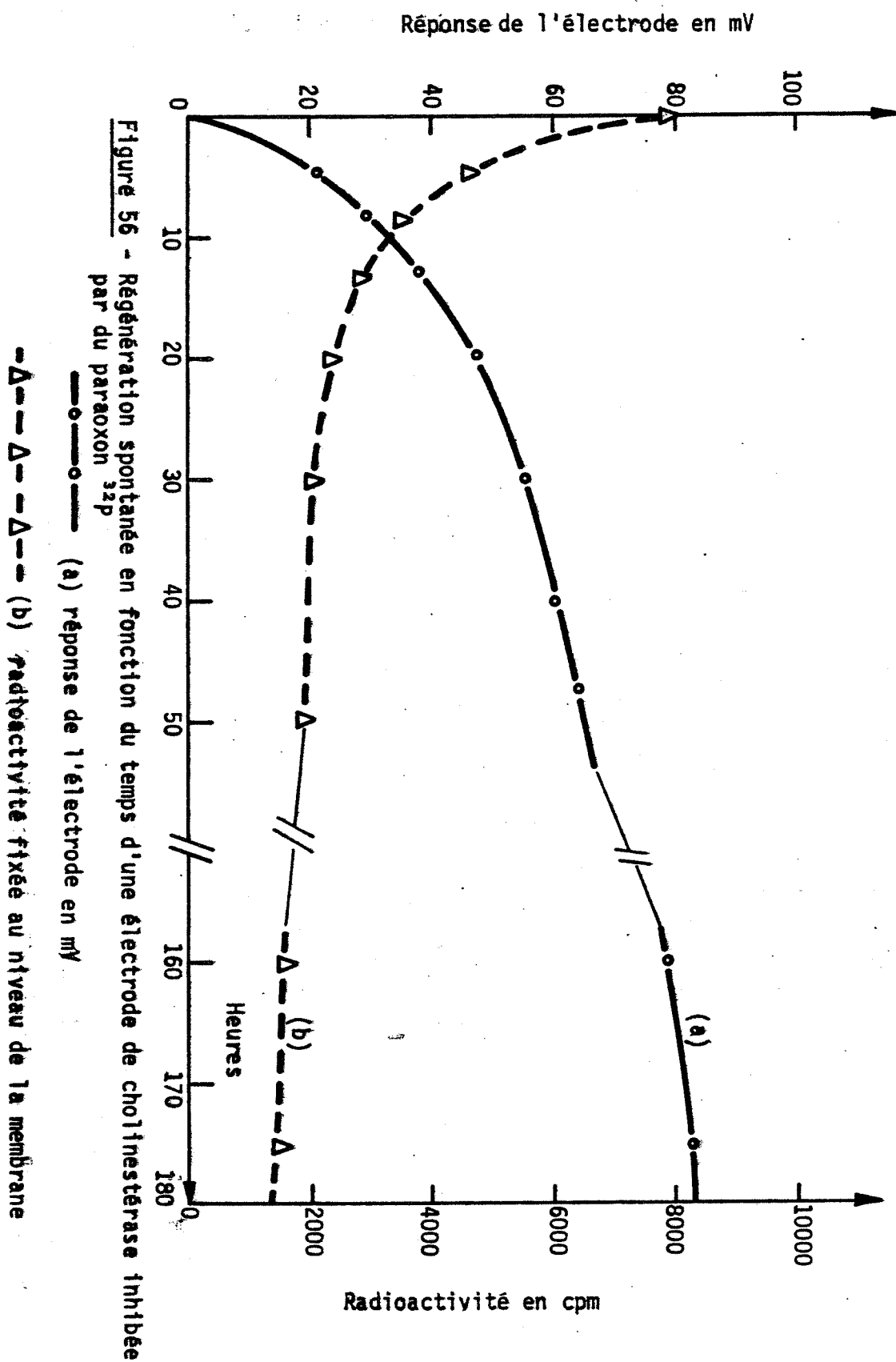
La courbe (a) représente le pourcentage d'inhibition d'une membrane de cholinestérase par une solution de paraoxon ^{32}p 10^{-6}M après un temps d'incubation de 5 minutes dans un milieu tampon de pH variable. On constate que l'action inhibitrice du paraoxon est optimale pour un pH égal à 7,4 environ (valeur de celui du serum physiologique), le milieu sérique est donc un terrain favorable à l'intoxication par les organophosphorés.

La courbe (b) nous montre le pourcentage de régénération de la membrane d'AChE inhibée au préalable pendant 5 minutes par une solution de paraoxon ^{32}p 10^{-6}M à pH = 7,4 puis traitée par une solution de PAM (10^{-4}M) pendant 5 minutes à différents pH. On constate que l'action régénératrice de la PAM est plus efficace vers les pH basiques.

IV-3-2-4 - Etude de la régénération spontanée de la membrane enzymatique

L'action des composés organophosphorés sur l'AChE est considérée comme une inhibition irréversible. Pourtant si l'on conserve dans du tampon une électrode d'AChE ayant été inhibée à 100 % par du paraoxon on constate après quelques jours de repos une restitution partielle de l'activité enzymatique. Il y a donc une régénération spontanée de l'enzyme. Nous avons vu d'autre part que l'action prolongée des organophosphorés empêchait de régénérer totalement l'enzyme par l'action des réactivateurs tel que la PAM. Il y a donc deux phénomènes contradictoires dans l'évolution de l'inhibition de l'enzyme : une régénération spontanée et une dénaturation possible en fonction du temps. Ces deux phénomènes sont liés au mécanisme d'inhibition de l'enzyme par l'organophosphoré.

Nous avons donc étudié la réactivation spontanée de l'AChE inhibée par le paraoxon. La littérature est pauvre sur ce sujet, la plupart des auteurs s'étant préoccupé de rechercher des antidotes. Bien que ALDRIDGE (31) et CASIDA (36) aient



formulé l'hypothèse d'une phosphorylation intermédiaire de l'enzyme, la première approche cinétique sur ce sujet n'est rapportée par HOVANEK qu'en 1977 ⁽⁹¹⁾. Celui-ci a étudié l'inhibition de l'AChE en solution par le Sarin, mais sa technique faisant appel à la dialyse pour récupérer l'enzyme inhibée en solution est laborieuse et imprécise.

La mesure de l'activité des enzymes fixées directement au niveau de l'électrode nous a permis de suivre facilement la régénération spontanée de l'enzyme au cours du temps. Les mesures de radioactivité du paraoxon - ^{32}P par effet Cerenkov nous permettent d'associer cette régénération de l'enzyme et la présence de l'inhibition au niveau même de la membrane.

Etude expérimentale :

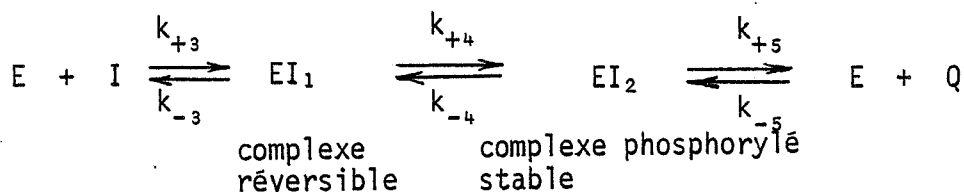
La régénération spontanée est étudiée au moyen du dispositif expérimental décrit au paragraphe (III-5-1-1) qui permet de mesurer simultanément l'activité enzymatique et la radioactivité déposée sur la membrane par effet Cerenkov. Le processus d'inhibition précédent est toujours adopté. Le temps d'incubation est fixé à 5 minutes pour des solutions d'organophosphorés de $4.6 \cdot 10^{-5}\text{M}$ marquées au ^{32}P (1,4 μCi). Après lavage en continu des membranes par une solution tampon, on suit l'activité enzymatique et la radioactivité pendant 8 jours.

Résultats et discussion :

La courbe (a) de la figure (56) représente l'activité enzymatique exprimée par la réponse d'une électrode d'AChE au cours de la régénération spontanée. On constate tout au long des 8 jours une augmentation progressive de l'activité enzymatique. La première mesure est faite à temps $t = 0$ où l'électrode est séparée de la solution inhibitrice. Cette régénération spontanée s'accompagne d'une désorption progressive de l'inhibiteur comme l'exprime la courbe b de la figure (56) où l'on voit le taux de radioactivité décroître en fonction du temps. L'inhibition de l'AChE par l'organophosphoré n'est donc pas irréversible, et le regain d'activité est lié au départ de l'inhibiteur.

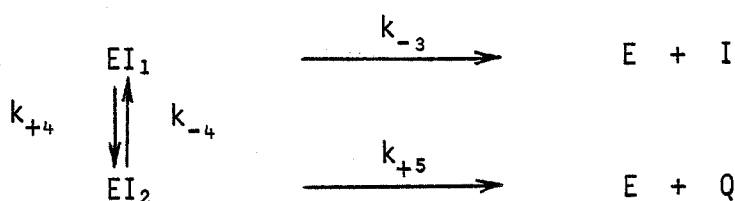
Compte tenu d'une part, que la régénération artificielle de l'enzyme au moyen de la PAM n'est pas totale lorsque la membrane enzymatique inhibée n'est pas traitée immédiatement par l'antidote, et d'autre part qu'il n'y a pas dénaturation de l'enzyme après inhibition (figure 56) on peut penser comme ALDRIDGE que l'enzyme

forme avec l'organophosphoré deux complexes successifs EI_1 et EI_2 d'après le schéma suivant :



EI_1 complexe régénérable facilement par la PAM, EI_2 plus stable restituant plus lentement l'activité enzymatique.

L'étude de la régénération spontanée par lavage continu ($[I] = 0$, $[Q] = 0$) met donc en jeu les réactions schématisées comme suit :



La concentration de EI_1 est donnée par l'équation différentielle suivante :

$$-\frac{d[EI_1]}{dt} = k_{-3} [EI_1] + k_{+4} [EI_1] \quad (1)$$

$$\text{soit : } [EI_1] = [EI_1]_0 e^{-(k_{-3} + k_{+4}) \cdot t} \quad (2)$$

avec $[EI_1]_0$ concentration initiale d'enzyme inhibée.

La concentration de EI_2 est donnée par :

$$\frac{d[EI_2]}{dt} = k_{+4} [EI_1] - k_{+5} [EI_2] \quad (3)$$

$$\text{soit : } \frac{d[EI_2]}{dt} + k_{+5} [EI_2] = k_{+4} [EI_1] \quad (4)$$

La résolution de l'équation sans second membre :

$$\begin{aligned} \frac{d[EI_2]}{dt} + k_{+5} [EI_2] &= 0 \\ [EI_2] &= K \cdot e^{-k_{+5} \cdot t} \end{aligned} \quad (5)$$

donne la solution générale de l'équation (4) par variation de la constante K :

$$[EI_2] = \frac{k_{+4}}{k_{+5} - \lambda} [EI_1]_0 e^{-\lambda t} + C e^{-k_{+5}t} \quad (6)$$

avec $\lambda = k_{-3} + k_{+4}$

les conditions aux limites permettent d'obtenir la valeur de la constante C.

si $t = 0$, $[EI_2] \approx 0$, on a :

$$C = - \frac{k_{+4}}{k_{+5} - \lambda} [EI_1]_0$$

d'où l'équation représentative de l'évolution de EI_2 :

$$[EI_2] = \frac{k_{+4}}{k_{+5} - \lambda} [EI_1]_0 (e^{-\lambda t} - e^{-k_{+5}t}) \quad (7)$$

Comme on mesure la radioactivité globale A^* de l'organophosphoré complexé avec l'enzyme immobilisée, on mesure donc la somme des concentrations de $[EI_1]$ et de $[EI_2]$. $A^* = f([EI_1] + [EI_2])$

$$A^* = f([EI_1] + [EI_2]) = f \left[[EI_1]_0 e^{-\lambda t} + \frac{k_{+4}}{k_{+5} - \lambda} [EI_1]_0 (e^{-\lambda t} - e^{-k_{+5}t}) \right] \quad (8)$$

soit :

$$A^* = f[EI_1]_0 \left[\left(1 + \frac{k_{+4}}{k_{+5} - \lambda}\right) e^{-\lambda t} + \frac{k_{+4}}{\lambda - k_{+5}} e^{-k_{+5}t} \right] \quad (9)$$

limites :

si t tend vers 0 $A^* = f[EI_1]_0$

si t tend vers ∞ $A^* = 0$, l'enzyme peut se régénérer totalement.

L'équation (9) est la somme de trois fonctions exponentielles du temps dont l'une est toujours de signe opposé aux deux autres suivant que $\lambda - k_{+5}$ est positif ou négatif.

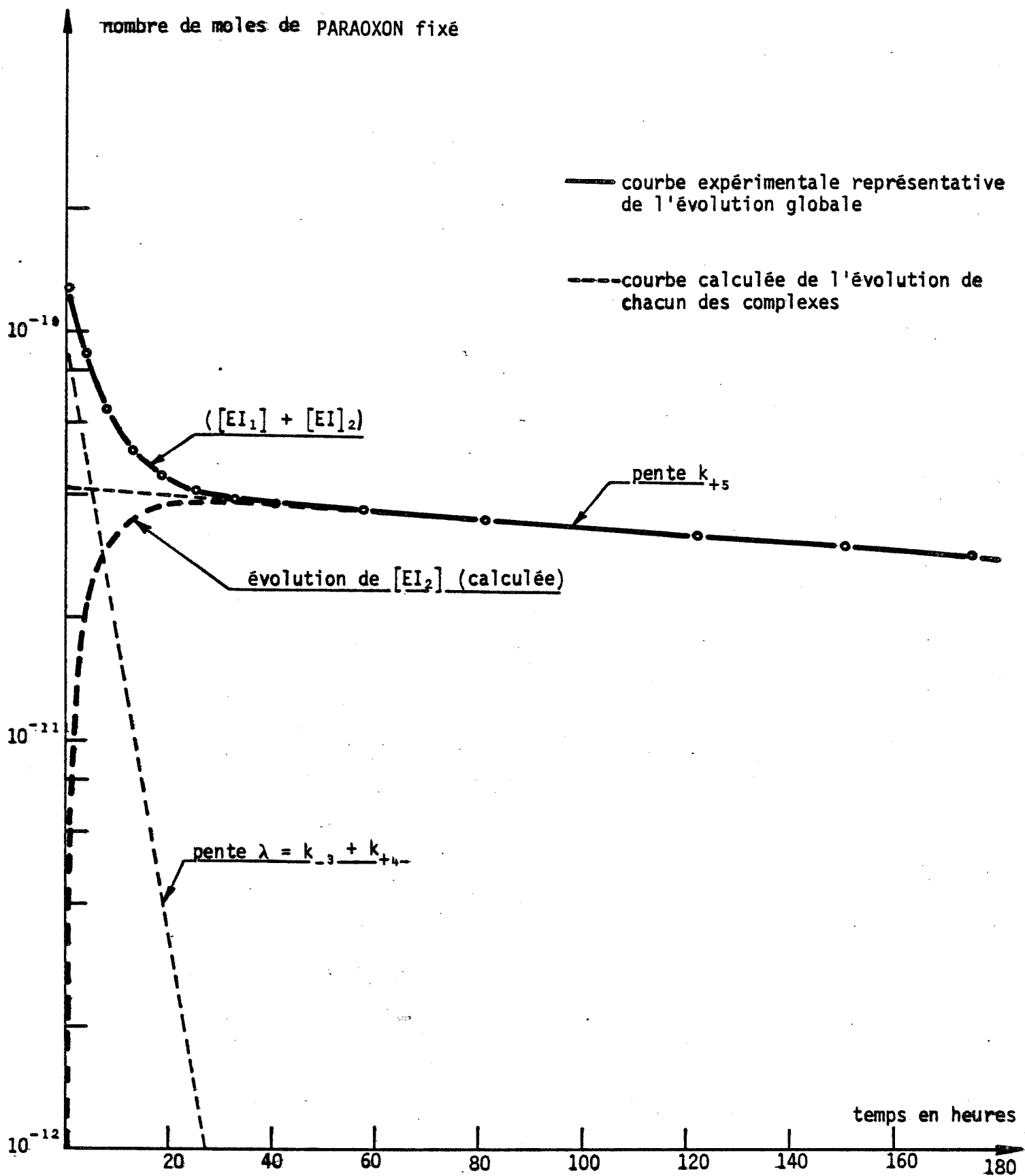


Figure 57 - Variation des concentrations en inhibiteur phosphoré au niveau de la membrane d'AChE en fonction du temps au cours de la régénération spontanée.

La figure (56) exprimant la radioactivité en fonction du temps (équation 9) laisse penser que nous avons à faire à une somme de deux exponentielles de même signe. Ceci nous conduit à émettre les hypothèses suivantes :

$$1) k_{+5} < \lambda$$

$$2) \lambda - k_{+5} > k_{+4}$$

On aurait alors une équation de ce type :

$$A^* = A_1 e^{-\lambda t} + A_2 e^{-k_{+5} t}$$

A^* est une fonction monotone décroissante somme de deux exponentielles du temps où A_1 et A_2 sont des constantes positives. En coordonnées semi-logarithmiques, l'expression d'une telle fonction tend vers une droite quand t augmente indéfiniment. Cette droite est représentative de la deuxième exponentielle, celle qui décroît la moins vite. La figure 57 représente en coordonnées semi-logarithmiques les concentrations d'organophosphoré fixé sur la membrane en fonction du temps. Elle montre que le système correspond bien à une somme d'exponentielle de même signe, donc à $\lambda > k_{+5}$.

La pente de la droite permet de déterminer la valeur de k_{+5} qui est la constante la plus faible. Par différence point par point avec la courbe A^* on peut décrire la droite de pente $-\lambda$ représentative de la première exponentielle.

A partir de la deuxième pente ($\lambda = k_{-3} + k_{+4}$) et la deuxième ordonnée à l'origine ($r = \frac{k_{+4}}{k_{-3} + k_{+4} - k_{+5}}$)

on obtient : $k_{+4} = r(\lambda - k_{+5})$

$$k_{-3} = \lambda - k_{+4}$$

Les valeurs numériques moyennes obtenues sur trois expériences donnent :

$$k_{+5} = 2.18 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$$

$$\lambda = k_{-3} + k_{+4} = 1.7 \cdot 10^{-1} \text{ h}^{-1}$$

$$k_{-3} = 1.2 \cdot 10^{-1} \text{ h}^{-1}$$

$$k_{+4} = 5.3 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$$

On peut vérifier que $k_{+5} < \lambda$ et que $\lambda - k_{+5} > k_{+4}$; nos hypothèses étant ainsi justifiées.

Evolution des concentrations en EI_2 et EI_1

Les valeurs numériques précédentes vont nous permettre de déterminer la concentration en EI_1 et EI_2 à partir de l'équation 2 et 7 respectivement. L'équation 7 faisant intervenir la différence de deux exponentielles positives montre que $[EI_2]$ passe par un maximum à t_{\max} où la dérivée de l'équation (7) s'annule :

$$\frac{d[EI_2]}{dt} = \frac{k_{+4}}{k_{+5} - \lambda} [EI_1]_0 (-\lambda e^{-\lambda t_{\max}} + k_{+5} e^{-k_{+5} t_{\max}}) = 0$$

ce qui donne :

$$t_{\max} = \frac{\text{Log } \frac{\lambda}{k_{+5}}}{\lambda - k_{+5}} \quad (10)$$

A t_{\max} :

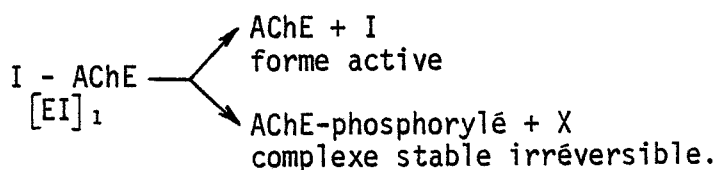
$$[EI_2] = [EI_1] \cdot \frac{k_{+4}}{k_{+5}} \quad (11)$$

La figure 57 montre l'évolution de la concentration en EI_2 . On voit que sa concentration est maximum au bout de 26 heures et qu'ensuite celle-ci commence à décroître régulièrement par suite de sa décomposition en $E + Q$. On peut voir sur la même figure l'évolution de la concentration en EI_1 .

Discussion :

Grâce à notre méthode expérimentale nous avons pu démontrer l'hypothèse d'Aldridge et formuler un modèle réactionnel en accord avec les résultats expérimentaux.

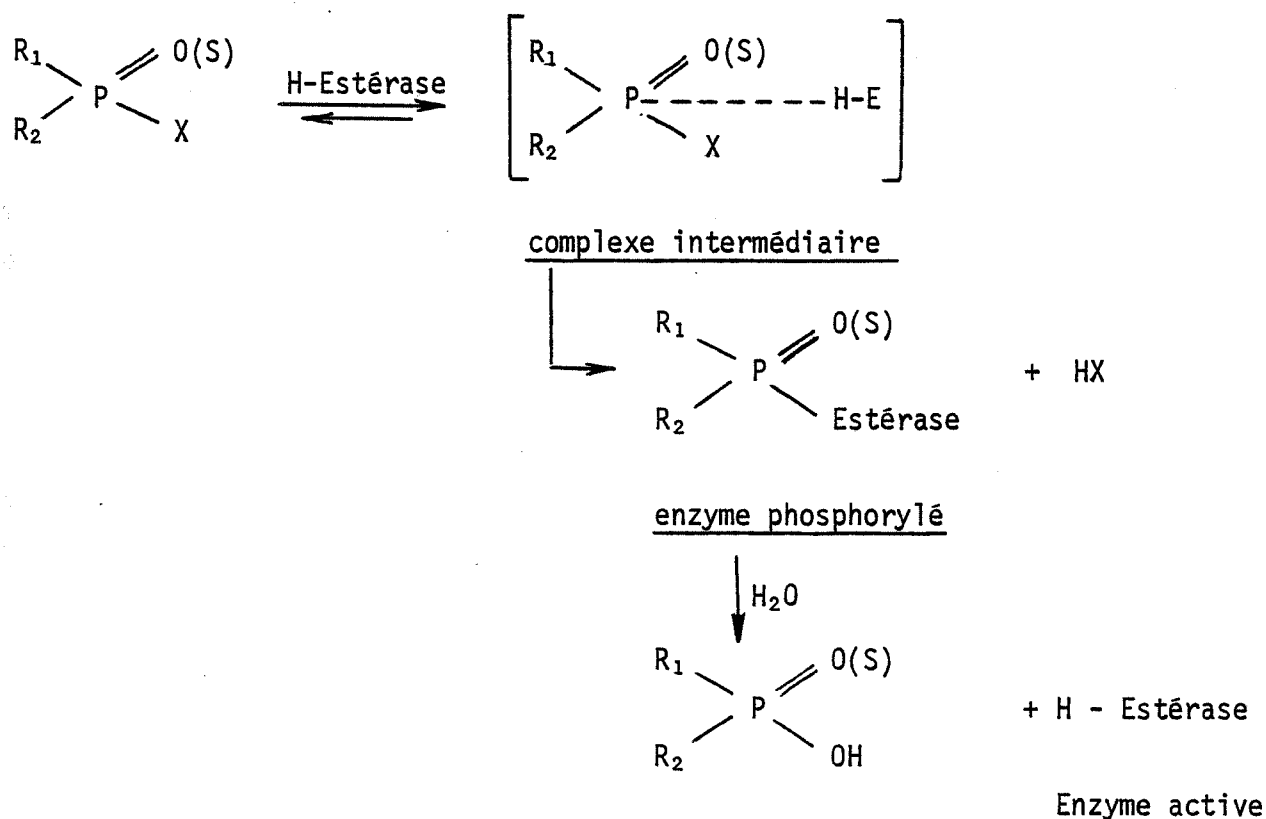
Dans son étude sur la régénération de l'AChE inhibée par le Sarin, HOVANEK envisage le modèle suivant :



Il est conduit à formuler que l'enzyme ne peut se régénérer totalement et tend vers un palier d'activité inférieure à la valeur initiale.

Ce schéma relativement simple n'est pas en accord avec le principe de la réversibilité ni avec les résultats expérimentaux si l'on prolonge suffisamment longtemps l'expérience. En fait cette simplification provient de ses conditions expérimentales qui entraînent des pertes d'enzyme lors des nombreuses dialyses et de la séparation imparfaite de la solution enzymatique et inhibitrice. Dans notre cas, les mesures au niveau de la membrane à l'aide de la radioactivité ne présentent pas ces inconvénients et permettent une précision plus grande. L'effet de la radiolyse de l'organophosphoré sur lui-même doit être évoqué. Mais des comparaisons au moyen de l'électrode enzymatique sur des produits "froids" ont montré des cinétiques de régénération analogue à celle du produit marqué.

Ainsi donc l'enzyme en réagissant avec l'organophosphoré forme un premier complexe EI_1 qui évolue vers la formation d'un complexe EI_2 plus stable. L'enzyme "phosphorylé" peut s'hydrolyser lentement pour donner un produit d'hydrolyse et l'enzyme libre de nouveau active selon le schéma :



Grâce à ce mécanisme on comprend mieux le comportement de la PAM vis-à-vis de l'enzyme inhibée. L'antidote a une action sur le complexe réversible et permet la régénération immédiate de l'enzyme mais n'est pas suffisamment puissante pour attaquer le second complexe plus stable. Cela explique pourquoi il n'est plus possible de régénérer rapidement et totalement à l'aide de la PAM une membrane enzymatique qui a séjourné longtemps avec l'organophosphoré.

IV-4 - ETUDE THEORIQUE D'UN MODELE SIMULANT LE COMPORTEMENT D'UN CAPTEUR ENZYMATIQUE

En enzymologie homogène classique, il est commode, bien que peu précis, de représenter l'équation de MICHAELIS MENTEN par une transformée linéaire telle que la représentation selon LINEWEAVER-BURK.

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_m^0} \left(1 + \frac{K_m^0}{[S]} \right)$$

Les intersections de la droite représentative de l'équation précédente avec l'axe des ordonnées permet de déterminer la valeur de v_m^0 et avec l'axe des abscisses celle de K_m^0 .

Cette représentation appliquée à une enzyme fixée n'est pas linéaire comme le montre la figure (58) pour une membrane de cholinestérase immobilisée sur une électrode. L'étude théorique en phase hétérogène que nous abordons maintenant montre que les phénomènes de diffusion sont la cause du non-respect de la cinétique MICHAELIENNE.

IV-4-1 - ETUDE DE LA CINETIQUE ENZYMATIQUE EN PHASE HETEROGENE

Rappelons que dans le cas où l'enzyme transforme irréversiblement son substrat en produit on peut exprimer la vitesse de la réaction selon l'expression :

$$v^0 = \frac{d[P]}{dt} = - \frac{d[S]}{dt} = v_m^0 \frac{[S]}{K_m^0 + [S]}$$

Pour un système enzymatique donné, la vitesse de réaction est fonction du rapport $\frac{[S]}{K_m^0}$

$$\text{- si } \frac{[S]}{K_m^0} \rightarrow 0 \quad v^0 \rightarrow \frac{v_m^0}{K_m^0} [S] \quad \text{cinétique du premier ordre}$$

$$\text{- si } \frac{[S]}{K_m^0} \rightarrow \infty \quad v^0 \rightarrow v_m^0 \quad \text{cinétique d'ordre 0}$$

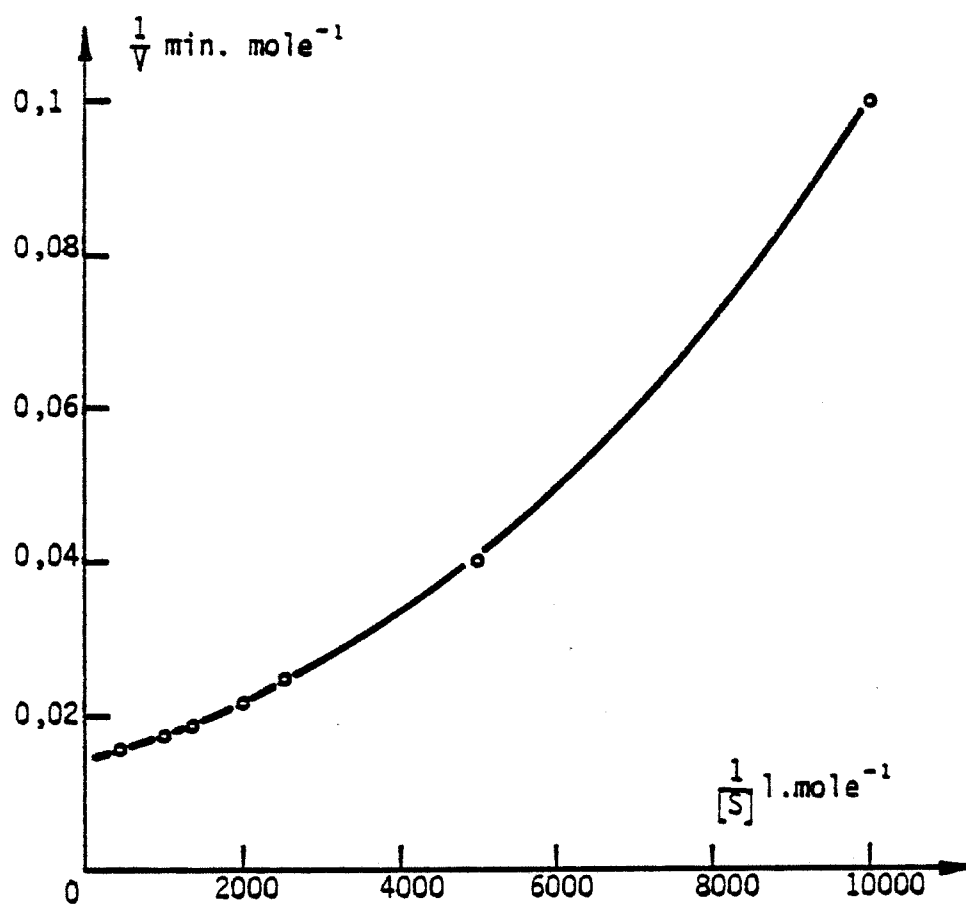
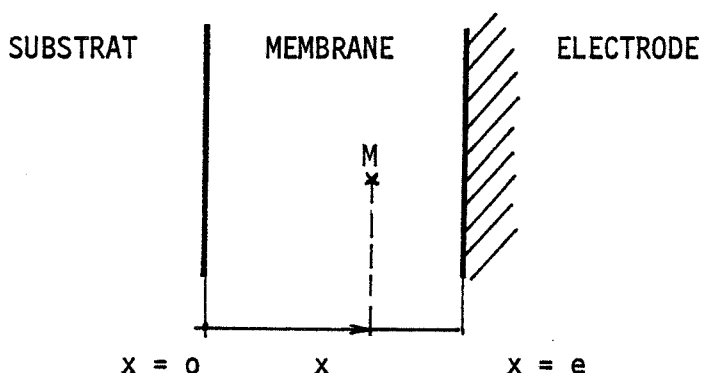


Figure 58 - Représentation de Lineweaver Burk de l'inverse de la vitesse en fonction de l'inverse de la concentration en substrat pour la cholinestérase fixée sur une membrane.

Dans le cas où l'enzyme est en phase insoluble, il y a pénétration de substrat à travers la couche active et formation de produit au fur et à mesure de la réaction.

Considérons une membrane enzymatique d'épaisseur e perméable au substrat S déposée sur la tête active d'une électrode :

- soit un point M situé à la distance x de la surface externe de la membrane au contact du substrat qui diffuse dans l'axe des x , perpendiculaire à la membrane comme le montre la figure suivante :



Pour chaque valeur de x dans la membrane, la variation de la concentration du substrat en fonction du temps est liée à un terme de réaction et un terme de diffusion.

$$\frac{\partial [S]}{\partial t} = \left(\frac{\partial [S]}{\partial t}\right)_{\text{diffusion}} + \left(\frac{\partial [S]}{\partial t}\right)_{\text{réaction}} \quad (1)$$

le terme de réaction peut être exprimé par l'équation :

$$\left(\frac{\partial [S]}{\partial t}\right)_{\text{réaction}} = - \frac{V_m^0 [S]}{K_m^0 + [S]} \quad (2)$$

le terme de diffusion est régi par la seconde loi de Fick :

$$\left(\frac{\partial [S]}{\partial t}\right)_{\text{diffusion}} = D_s \frac{\partial^2 [S]}{\partial x^2} \quad (3)$$

où D_s est le coefficient de diffusion du substrat ayant pour dimension : $L^2 T^{-1}$

le système est défini par les équations suivantes :

$$\frac{\partial [S]}{\partial t} - D_s \frac{\partial^2 [S]}{\partial x^2} + \frac{V_m^0 [S]}{K_m^0 + [S]} = 0 \quad (4)$$

$$\frac{\partial [P]}{\partial t} - D_p \frac{\partial^2 [P]}{\partial x^2} - \frac{V_m^0 [S]}{K_m^0 + [S]} = 0$$

avec D_p coefficient de diffusion du produit (5)

Si on remplace x par $x' = \frac{x}{e}$ et t par $t' = \frac{t}{e^2/D_s}$, x' et t' sont sans dimension.

K_m^0 est choisi comme une concentration unité : $s = \frac{[S]}{K_m^0}$ et $p = \frac{[P]}{K_m^0}$ sont substitués respectivement à $[S]$ et $[P]$; s et p sont sans dimension.

Les équations (4) et (5) peuvent être exprimées à l'aide des variables réduites :

$$\frac{\partial s}{\partial t} - \frac{\partial^2 s}{\partial x^2} + \sigma \frac{s}{1+s} = 0 \quad (6)$$

$$\frac{\partial p}{\partial t} - \frac{D_p}{D_s} \cdot \frac{\partial^2 p}{\partial x^2} - \sigma \frac{s}{1+s} = 0 \quad (7)$$

où

$$\sigma = \frac{V_m^0}{K_m^0} \cdot \frac{e^2}{D_s}$$

Ces équations déterminent les profils de concentration de S et de P à l'intérieur de la couche active.

En pratique on ne connaît que les concentrations $[S]_0$ du substrat et $[P]_0$ du produit à l'interface solution-couche active. Comme les composés S et P ne peuvent traverser l'électrode, leur profil au point d'abscisse $x = e$ possède une tangente horizontale.

On peut donc résoudre les équations (6) et (7) en utilisant des conditions aux bornes symétriques pour une demi membrane d'épaisseur double. Ces équations n'ont pas de solution analytique générale. A l'état stationnaire des solutions approchées peuvent être obtenues par développement en série. L'analyse numérique

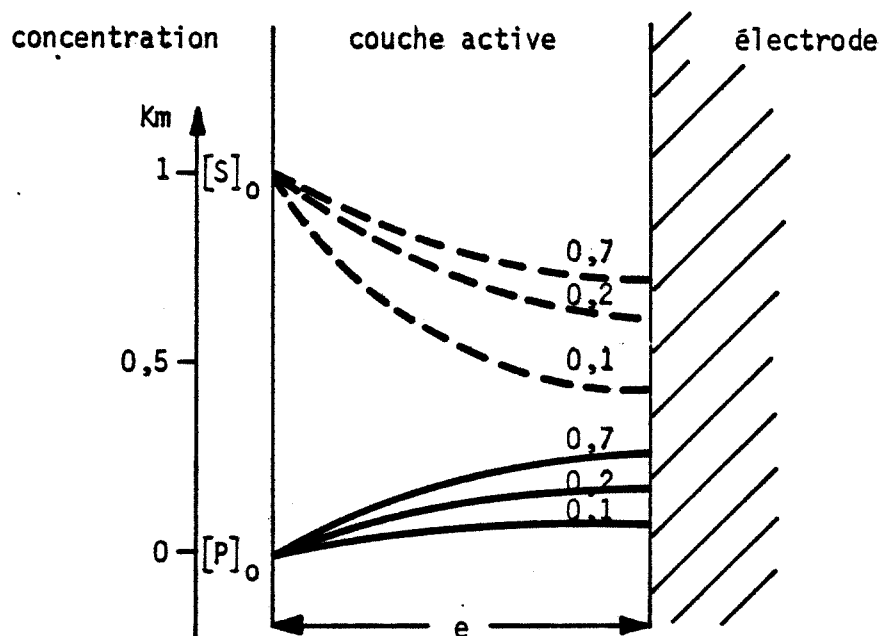


Figure 60 - Evolution calculée des profils de concentration du substrat (-----) et du produit (——) dans une couche active fixée sur une électrode pour une concentration extérieure en substrat égale au K_m caractéristique de la membrane :

$$V_m^o = 1,92 \cdot 10^{-6} \text{ Mole cm}^{-3} \Delta^{-1}$$

$$K_m^o = 2 \cdot 10^{-5} \text{ Mole cm}^{-3}$$

$$e = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ cm}$$

$$D_p = D_s = 3,2 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \Delta^{-1}$$

$$\text{unité de temps } \frac{e^2}{D_s} \text{ état stationnaire atteint à } 0,7 \frac{e^2}{D_s} \approx 3 \text{ min.}$$

sur ordinateur (92) permet d'obtenir des solutions en régime d'évolution.

La figure (60) montre l'évolution calculée des profils de concentration du substrat et du produit dans une couche active déposée sur une électrode pour des coefficients de diffusion déterminés à l'aide de la cellule de diffusion décrite dans le paragraphe III-5-1-a. Cette évolution ne dépend que de la valeur de :

$$\sigma = \frac{V_m^o}{K_m^o} \cdot \frac{e^2}{D_s}$$

IV-4-2 - ETUDE DE L'INHIBITION EN PHASE HETEROGENE

La vitesse de la réaction enzymatique en présence d'un inhibiteur est modifiée par un terme $(1 + \frac{[I]}{K_I})$ qui affecte K_m^o , ou V_m^o ou les deux à la fois selon le type d'inhibiteur.

si $r = 1 + \frac{[I]}{K_I}$, les paramètres de l'inhibition compétitive ou de type K peuvent s'écrire :

$$K_m = r K_m^o$$

$$V_m = V_m^o$$

l'inhibition non compétitive ou type V.

$$K_m = K_m^o$$

$$V_m = \frac{V_m^o}{r}$$

l'inhibition anticompetitive type K, V

$$K_m = \frac{K_m^o}{r}$$

$$V_m = \frac{V_m^o}{r}$$

et deviennent les nouveaux paramètres dans le terme de réaction des équations de diffusion-réaction.

$$v = V_m \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

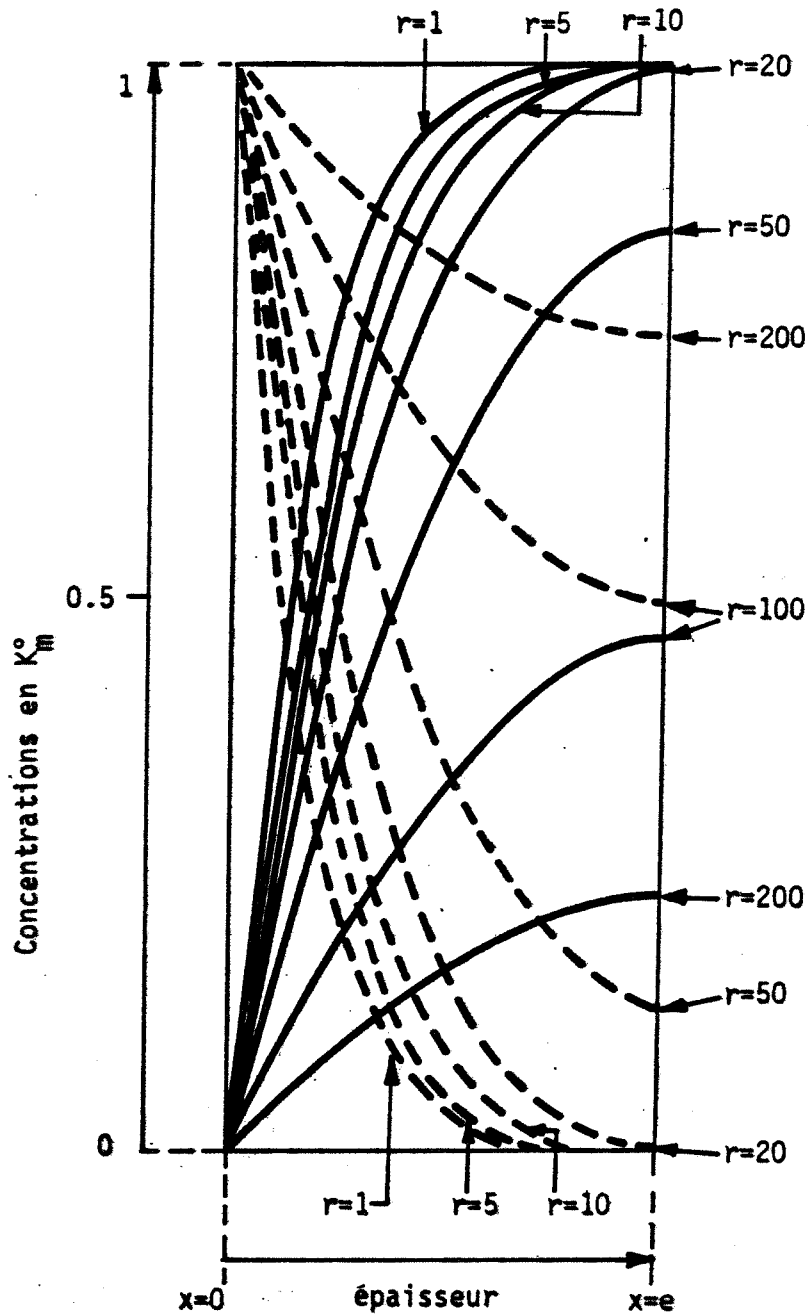


Figure 61 - Profils de concentration calculés du substrat (-----) et du produit (—) dans une membrane active en fonction des concentrations d'inhibiteur $[I]$. Les concentrations de substrat et de produit sont exprimées en K_m^o ; $V_m^o = 10^{-5} \text{ mole.cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$ $K_m^o = 10^{-5} \text{ mole.cm}^{-3}$
 $e = 2,5.10^{-3} \text{ cm}$ $D_s = D_p = 1.2.10^{-5} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$
 La concentration d'inhibiteur $[I]$ est exprimée en terme de

$$r = \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right).$$

$$D_s \frac{\partial^2 [S]}{\partial x^2} - V_m \frac{[S]}{K_m + [S]} = 0$$

$$D_p \frac{\partial^2 [S]}{\partial x^2} + V_m \frac{[S]}{K_m + [S]} = 0$$

Ces équations peuvent être résolues en analyse numérique sur ordinateur comme les équations précédentes ⁽⁶⁶⁾ en utilisant les variables réduites sans dimension.

$$s = \frac{[S]}{K_m^0} ; p = \frac{[P]}{K_m^0} ; r = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad \sigma = \frac{V_m \cdot e^2}{K_m \cdot D_s}$$

On admet pour simplifier que les coefficients de diffusion du substrat et du produit sont semblables ($D_s = D_p$), que V_m et K_m sont constants dans toute l'épaisseur de la membrane. La figure (61) montre les profils calculés de concentration de substrat et de produit dans une membrane active en fonction des concentrations $[I]$ d'inhibiteur exprimées en terme de $r = (1 + \frac{[I]}{K_I})$ pour une concentration de substrat $[S]_0 = K_m^0$ dans la solution interne.

IV-4-3 - CONDITIONS DE FONCTIONNEMENT DES ELECTRODES ENZYMATIQUES EN CAPTEURS

L'étude théorique précédente permet de définir les conditions de fonctionnement des électrodes enzymatiques selon l'usage qui leur est réservé : sensibilité soit au substrat, soit à l'inhibiteur.

a) Electrode sensible au substrat

L'électrode traduit la concentration $[P_e]$ du produit au contact de l'interface pour une concentration en substrat $[S_0]$ donnée. Les équations différentielles de diffusion-réaction montrent que cette concentration $[P_e]$ dépend de la vitesse de la réaction enzymatique :

$$v = V_m^0 \frac{[S_0]}{K_m^0 + [S_0]}$$

Quand les concentrations du substrat sont en excès par rapport au K_m^0 de l'enzyme ($[S_0] \gg K_m^0$) la courbe de réponse de l'électrode doit tendre vers un plateau puisqu'on atteint la vitesse maximum de la réaction, et ne dépendre que de la concentration des sites actifs de l'enzyme fixée :

$$V_m^0 = k_{+2} [E_0]$$

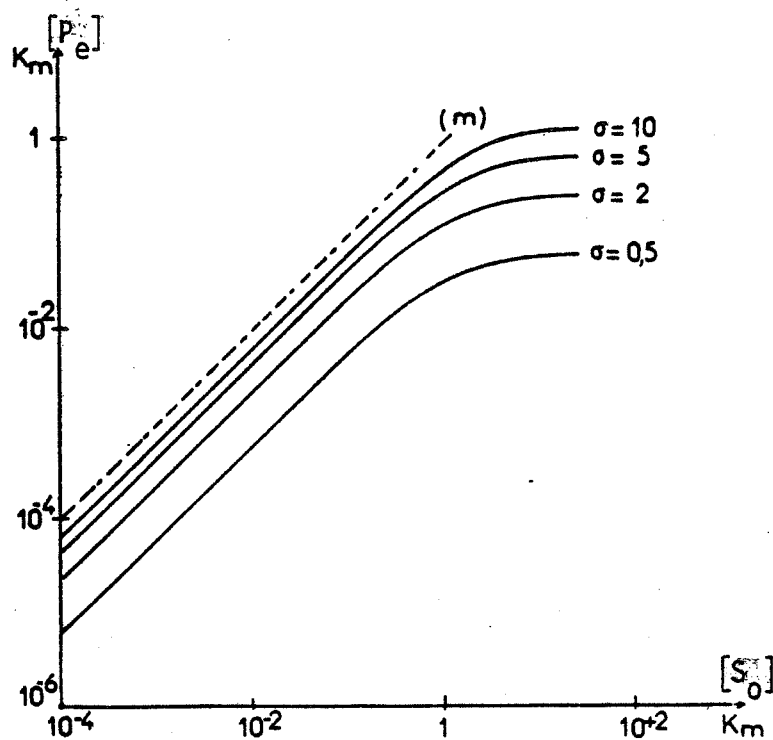


Figure 63 - Variation calculée en coordonnées logarithmiques des concentrations $[P_e]$ du produit au contact de l'électrode en fonction des concentrations $[S_0]$ du substrat dans la solution à doser pour différentes valeurs de :

$$\sigma = \frac{V_m^o}{K_m^o} \cdot \frac{e^2}{D_s} \text{ à l'état stationnaire.}$$

(m) droite correspondant à $[P_e] = [S_0]$

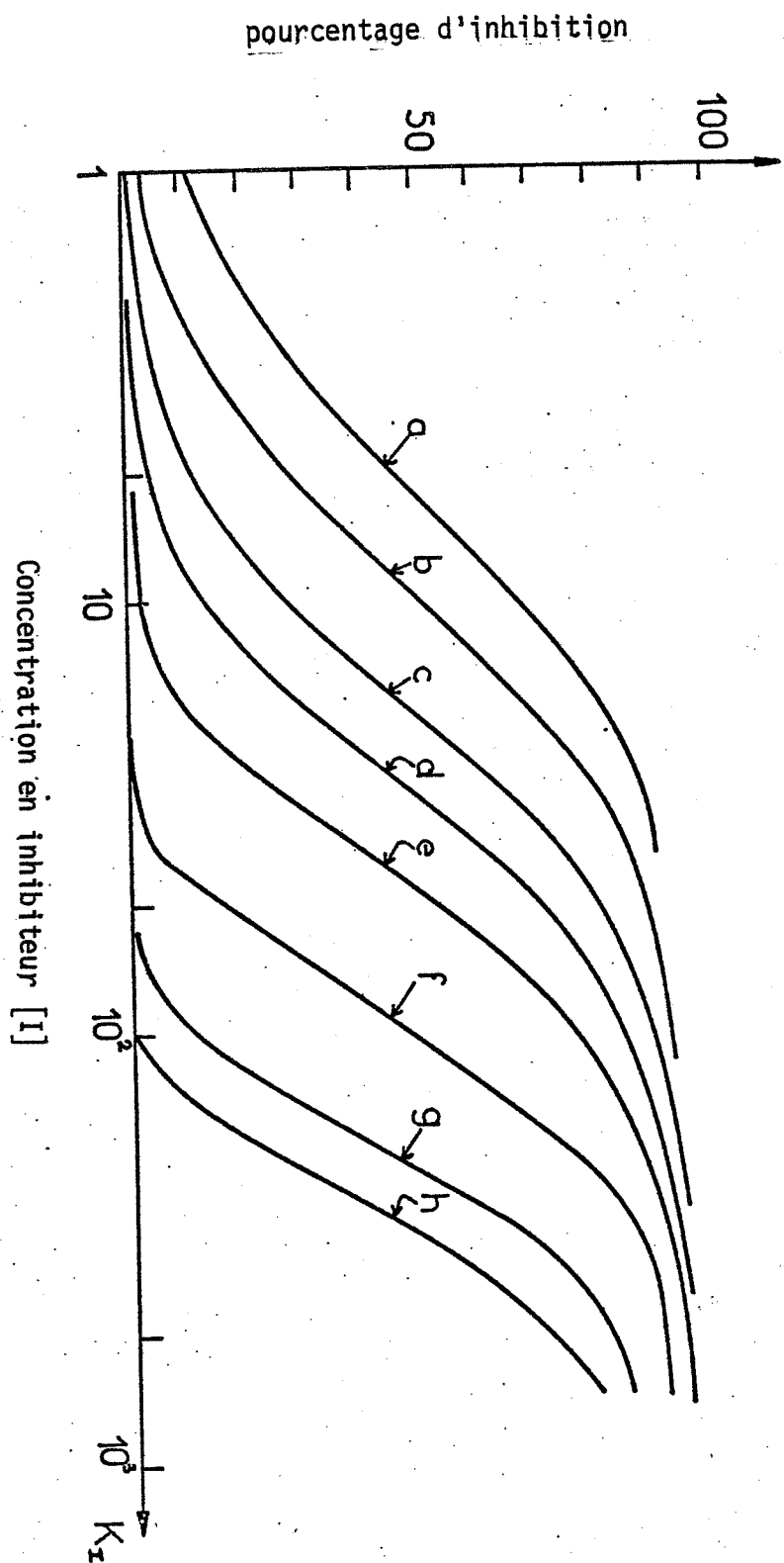


Figure 62 - Pourcentages d'inhibition calculés en fonction de la concentration en inhibiteur $[I]$ pour différentes activités enzymatiques de la membrane exprimée en V_m° en $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$

- | | |
|-----------------------|-----------------------|
| (a) $5 \cdot 10^{-7}$ | (e) $5 \cdot 10^{-6}$ |
| (b) 10^{-6} | (f) 10^{-5} |
| (c) $2 \cdot 10^{-6}$ | (g) $2 \cdot 10^{-5}$ |
| (d) $3 \cdot 10^{-6}$ | (h) $3 \cdot 10^{-5}$ |

Si la concentration du substrat est inférieure au K_m^o , la cinétique de la réaction tend à être du premier ordre, la réponse de l'électrode doit être une fonction linéaire de la concentration en substrat. On est dans les conditions de fonctionnement des capteurs, où le signal électrique doit être proportionnel à l'amplitude captée.

Si l'on représente en coordonnées logarithmiques les variations calculées à l'état stationnaire des concentrations $[P_e]$ du produit au contact de l'électrode en fonction des concentrations $[S_o]$ du substrat dans la solution dosée pour différentes valeurs de σ on obtient les courbes de la figure 63 ⁽¹⁶⁾. Ces courbes deviennent des droites lorsque les concentrations du substrat sont inférieures approximativement au dixième de K_m^o . Lorsque σ augmente indéfiniment, ces droites se rapprochent de la droite (m) correspondant à l'égalité des concentrations $[P_e] = [S_o]$.

On voit donc dans le cas où l'électrode enzymatique fonctionne comme capteur du substrat l'intérêt de travailler avec des valeurs de σ élevées car pour $[S_o]$ donnée, $[P_e]$ varie peu en fonction de σ .

b) Electrode sensible à l'inhibiteur :

Le maximum de vitesse V_m^o est une fonction de la quantité d'enzyme active après immobilisation qui dépend à la fois du temps de réticulation et de la concentration en agent réticulant. Pour un temps de réticulation et une concentration de glutaraldéhyde donnée, V_m^o est normalement proportionnelle à la quantité initiale d'enzyme immobilisée.

La figure 62 nous montre le pourcentage d'inhibition calculé en fonction des concentrations d'inhibiteur exprimées en terme de r pour différentes valeurs de V_m^o . On observe une translation vers la droite quand les valeurs de V_m^o augmentent. La réponse de l'électrode est moins affectée par les inhibiteurs lorsque la membrane enzymatique est très active. Ce déplacement de la limite de détection peut être expliqué sur la figure 61 où les profils de concentration de substrat et de produit sont donnés en fonction de r . Pour une concentration d'inhibiteur avec $r < 20$, l'activité de l'enzyme est encore élevée de sorte que toutes les molécules de substrat sont consommées avant d'atteindre la surface

active de l'électrode. La concentration de produit à la surface de l'électrode est alors la même, mais suffisamment élevée pour que le pourcentage d'inhibition soit nul. Dans cette région, l'électrode enzymatique ne peut détecter aucun inhibiteur. Il y a réaction de surface.

Pour une concentration en inhibiteur avec $r > 20$ l'activité de l'enzyme immobilisée est assez basse pour que les variations de substrat puissent atteindre la surface de l'électrode et affecter la concentration en produit à l'interface. Dans ce cas l'électrode enzymatique est sensible aux inhibiteurs, dont l'augmentation en concentration entraîne une décroissance linéaire de la concentration en produit $|P_e|$.

En conclusion : dans le cas où l'électrode enzymatique doit fonctionner comme capteur sensible aux inhibiteurs on a intérêt à réduire l'activité de la membrane enzymatique afin d'éviter les réactions de surface avec le substrat.

IV-4-4 - VERIFICATIONS EXPERIMENTALES

Lorsqu'on immobilise sur une électrode de verre des concentrations croissantes de cholinestérase dans l'albumine, on voit sur la figure 64 que pour une concentration d'acétylcholine $[S_0] = 10^{-2}M$ l'activité des membranes augmente pour atteindre un palier à partir d'un dépôt de 50 UI environ ($10,6 \text{ UI}/\mu\text{l}$). Au delà de cette concentration l'activité est pratiquement stationnaire bien que la quantité d'enzyme augmente. Si l'on soumet ces membranes enzymatiques à l'action des inhibiteurs tel que le paraoxon on constate (figure 65) que le taux d'inhibition diminue avec l'augmentation de la concentration d'enzyme fixée, ce qui vérifie bien les prévisions de l'analyse théorique. Cette propriété peut aussi être mise à profit pour utiliser l'électrode comme capteur sensible au substrat dans un milieu pollué par un inhibiteur sans perturbation importante du signal.

Le temps de réticulation, de même que la concentration en glutaraldéhyde ont leur importance car ils ont une action directe sur l'activité de la membrane.

La figure 66 montre la variation de l'activité enzymatique pour une même concentration initiale d'enzyme fixée en fonction des temps de réticulation. On constate une baisse de l'activité enzymatique avec l'augmentation du temps de réticulation parallèlement, on assiste à une sensibilité accrue de l'électrode pour les inhibiteurs (figure 67). On obtient des courbes similaires lorsqu'on augmente les concentrations en glutaraldéhyde.

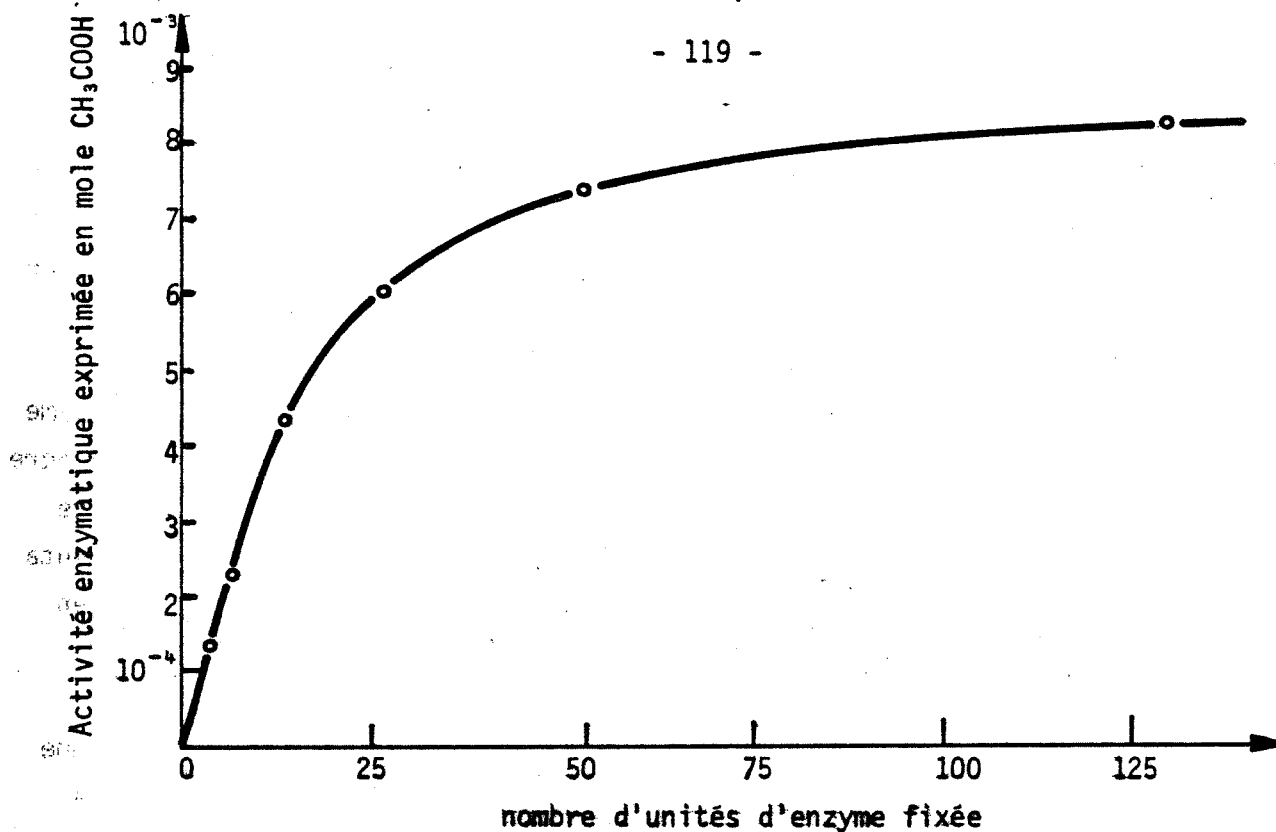


Figure 64 - Evolution de l'activité des électrodes d'AChE pour une concentration d'acétylcholine 10^{-3}M en fonction du nombre d'unités d'enzyme fixée au niveau de la membrane.

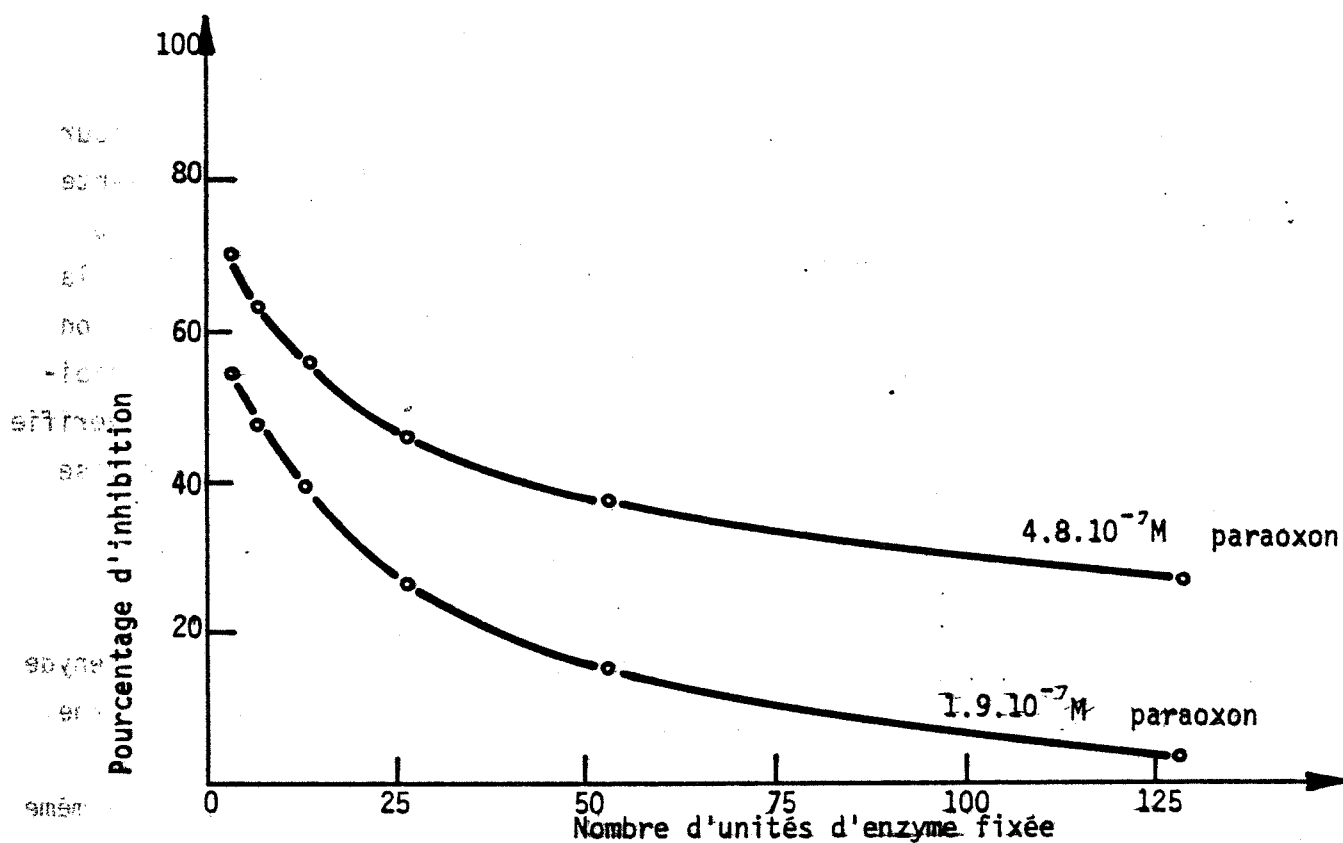


Figure 65 - Variation du pourcentage d'inhibition des électrodes d'AChE en fonction du nombre d'unités d'enzyme fixées sur la membrane vis-à-vis de solution de paraoxon ($4,8 \cdot 10^{-7}\text{M}$ et $1,9 \cdot 10^{-7}\text{M}$).

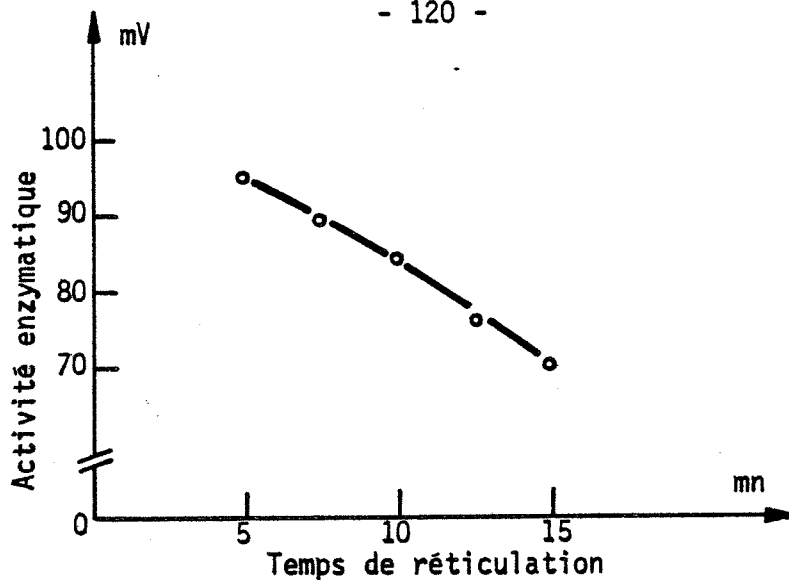


Figure 66 - Variation de l'activité enzymatique d'une électrode d'AChE en fonction du temps de réticulation.
 - concentration d'AChE initiale 17 UI
 - glutaraldéhyde 6 %

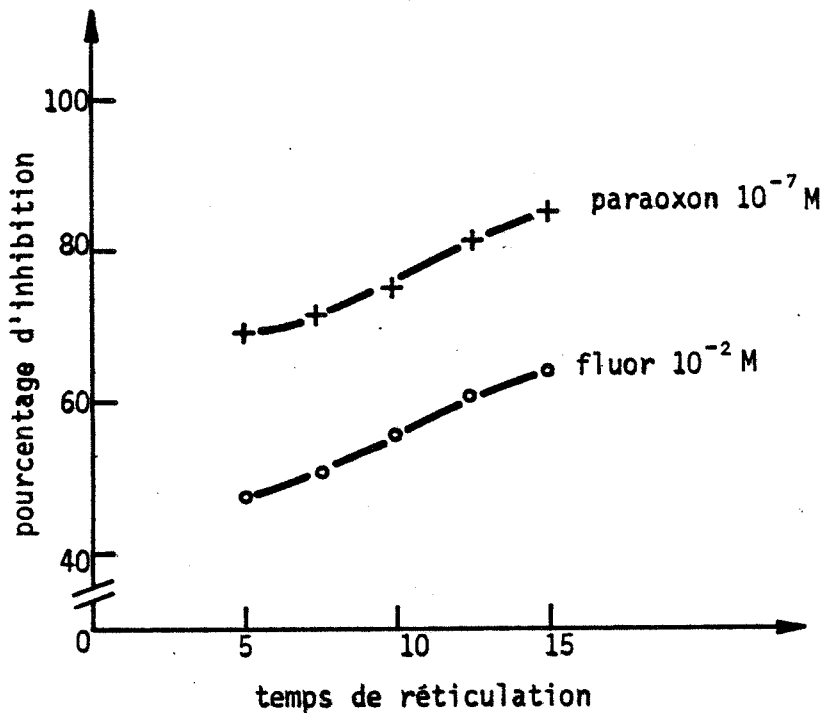


Figure 67 - Variation du pourcentage d'inhibition des membranes d'AChE réticulées suivant des temps variables soumise à des solutions de paraoxon 10^{-7} M (+ — + — + —) et de fluor (— o — o —) $\cdot 10^{-2}$ M

En utilisant le glutaraldéhyde comme agent pontant, sa concentration affecte l'activité de l'enzyme donc le V_m^o . Les fortes concentrations en glutaraldéhyde font décroître V_m^o et abaissent la limite de détection de l'électrode enzymatique vis-à-vis des inhibiteurs. Cette électrode affiche un comportement similaire pour un long temps de réticulation, qui dénature aussi l'enzyme et fait décroître V_m^o . Une translation des courbes d'inhibition en fonction des concentrations en glutaraldéhyde ou du temps de réticulation est caractéristique de la variation de l'activité enzymatique en accord avec l'interprétation théorique donnée précédemment.

CONCLUSION :

Une enzyme fixée sur membrane est loin d'avoir un comportement comparable à une enzyme en solution. L'étude en phase hétérogène montre que l'activité enzymatique est tributaire des phénomènes de diffusion. L'analyse des paramètres susceptibles de modifier l'activité de cette membrane a permis de définir les conditions de fonctionnement des électrodes enzymatiques et a montré qu'avec un choix judicieux il est possible d'utiliser ceux-ci comme capteurs, soit du substrat, soit des inhibiteurs.

IV-5 - APPLICATION : CAPTEURS POUR LE DOSAGE DE COMPOSES TOXIQUES

L'usage en médecine de certaines drogues, l'utilisation en grande quantité de produits toxiques comme les pesticides, l'augmentation de la pollution par les métaux lourds nécessitent à l'heure actuelle leur détection en continu au moyen de méthodes simples dans l'environnement et chez l'homme. L'effet de ces composés sur notre organisme dépend en grande partie de leur concentration dont seule une mesure précise permet d'apprécier le niveau de toxicité. Pour doser ces composés polluants, deux possibilités viennent à l'esprit : la première est d'utiliser les techniques analytiques existantes ⁽⁹³⁾, la deuxième consiste à reproduire au niveau des capteurs à enzymes immobilisées le principe de l'inhibition des systèmes enzymatiques au cours de l'empoisonnement de notre organisme ou du milieu naturel. Nous développons cette dernière méthode parce qu'elle présente l'avantage de doser ces polluants ou ces drogues selon leur degré de toxicité physiologique.

L'inhibition des enzymes : la cholinestérase ou l'uréase en solution aqueuse par les insecticides ⁽⁹⁴⁾ ⁽⁹⁵⁾ ou les ions métalliques a fait l'objet de plusieurs travaux à des buts analytiques. Divers auteurs ont cherché à doser ces composés polluants par mesure de l'activité de l'enzyme libre au moyen de méthodes classiques. Citons la méthode titrimétrique ⁽⁹⁶⁾. On peut aussi mesurer la variation ΔpH correspondante ⁽²²⁾ ⁽⁹⁵⁾. L'activité de l'enzyme peut aussi être déterminée manométriquement à partir du dégagement de CO_2 produit directement par la réaction ⁽⁹⁷⁾ ou à la suite de l'acidification d'une solution tampon bicarbonate résultant de la réaction d'hydrolyse. Les méthodes colorimétriques utilisent des substrats particuliers dont l'hydrolyse enzymatique conduit à des composés colorés ⁽⁹⁸⁾ ⁽⁹⁹⁾ ⁽¹⁰⁰⁾. Des méthodes fluorimétriques ont été appliquées mais elles nécessitent des dérivés fluorescents ⁽¹⁰¹⁾. D'autres auteurs ont choisi de déterminer l'activité enzymatique par la mesure directe de la concentration en substrat qui n'est pas décomposé par la réaction ⁽¹⁰²⁾. Dans le cas où la réaction est exothermique il est possible d'utiliser la microcalorimétrie ⁽¹⁰³⁾.

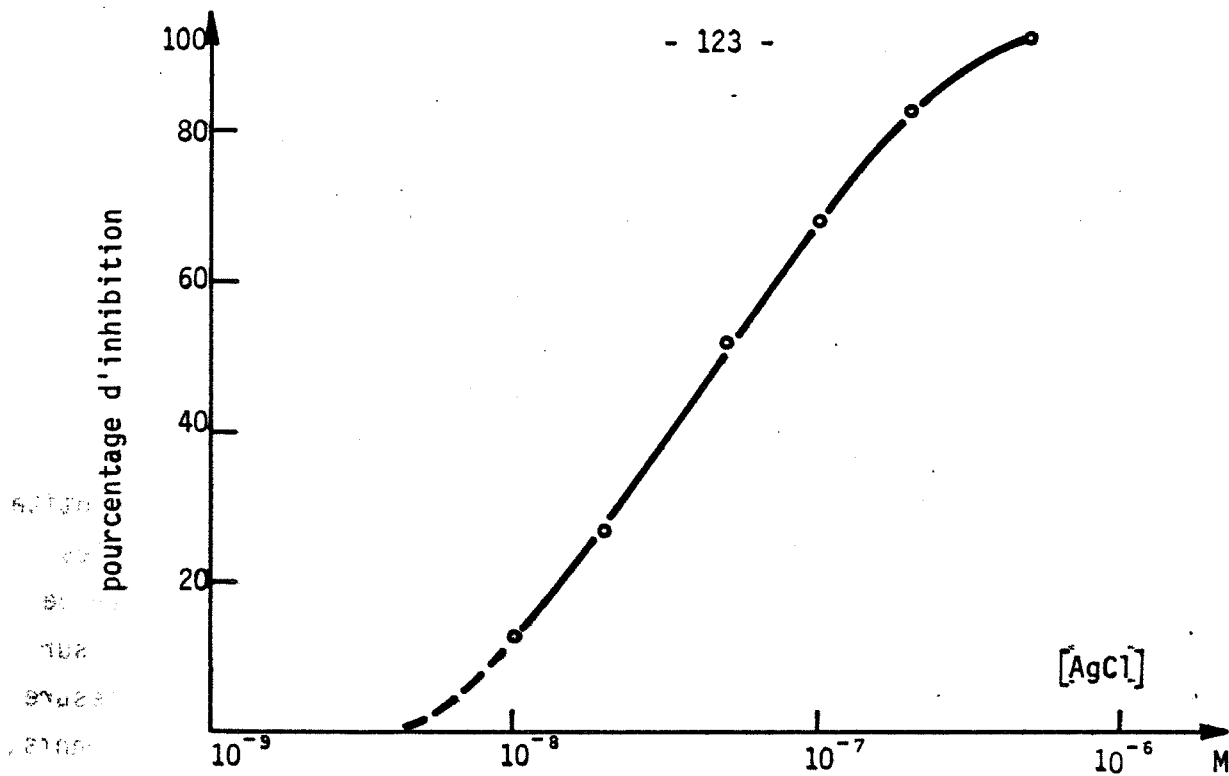


Figure 67 - Courbe de dosage de Ag^+ à l'aide d'une électrode à uréase de 4 unités fixées sur la membrane pour un temps d'incubation 30 min. tampon pH = 7,6

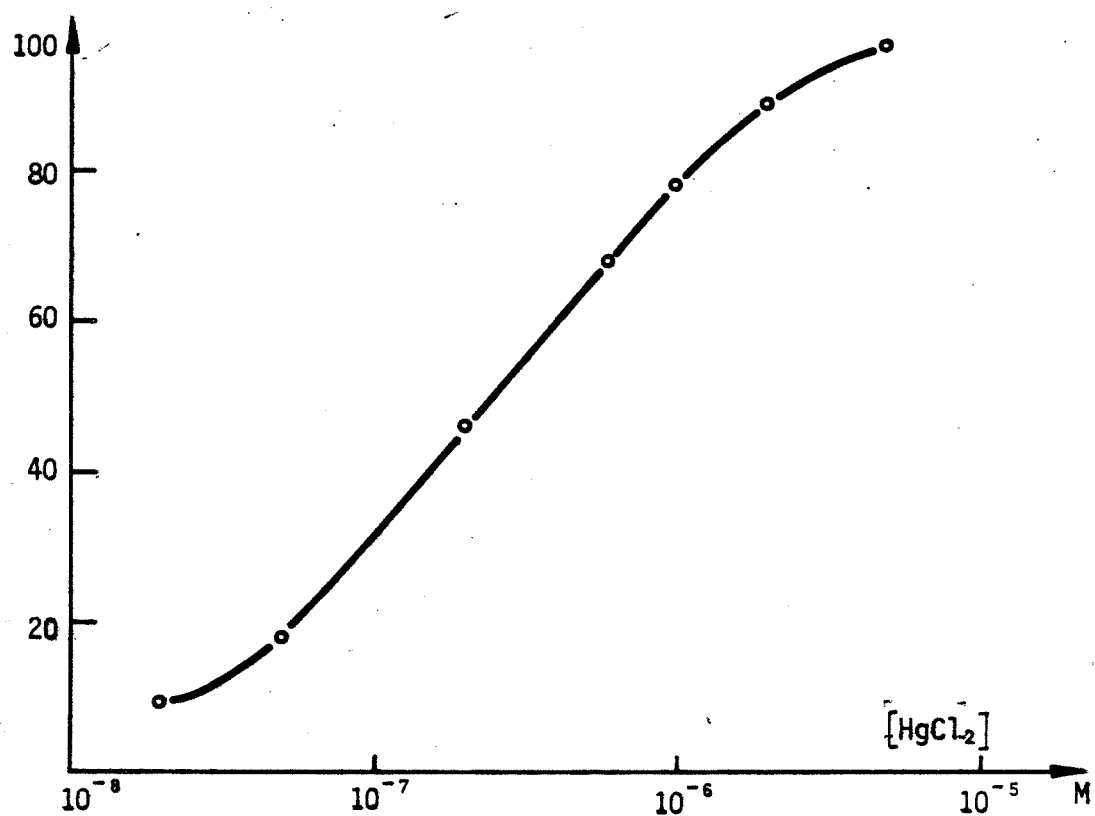


Figure 68 - Courbe de dosage de Hg^{2+} à l'aide d'une électrode à uréase de 10 unités fixées sur la membrane, pour un temps d'incubation 15 min. tampon pH = 7

Ces différentes techniques présentent un point commun : l'enzyme utilisée est jetée après chaque mesure. Or l'extraction des enzymes à partir d'organisme vivant en fait des substances coûteuses (notamment la cholinestérase) dont l'utilisation en une seule fois n'est pas justifiée. De plus ces techniques souvent élaborées ne peuvent être mises en oeuvre qu'en laboratoire bien équipé.

Les résultats de cette étude, en particulier de l'analyse théorique des profils de concentration à l'intérieur de la membrane enzymatique conduit à l'utilisation avantageuse des électrodes enzymatiques comme capteur permettant la détection et le dosage répétés de certains ions métalliques, drogues parasymphicométiques et insecticides.

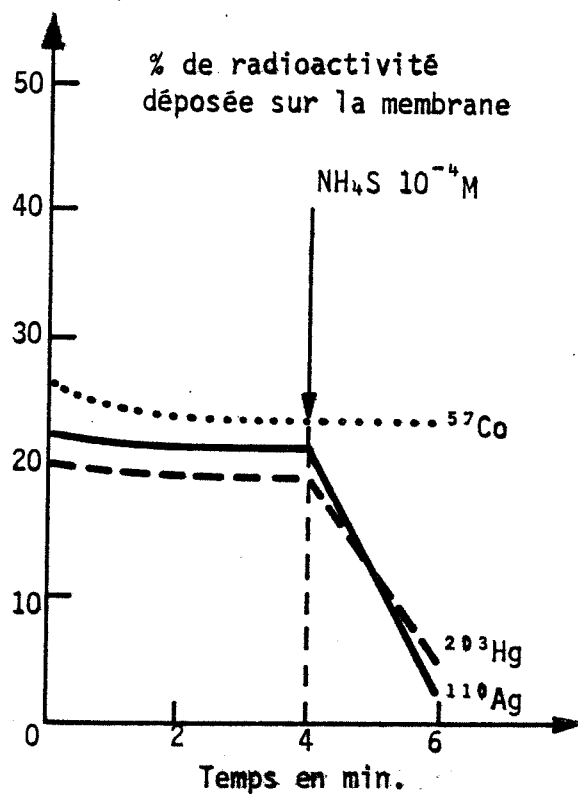
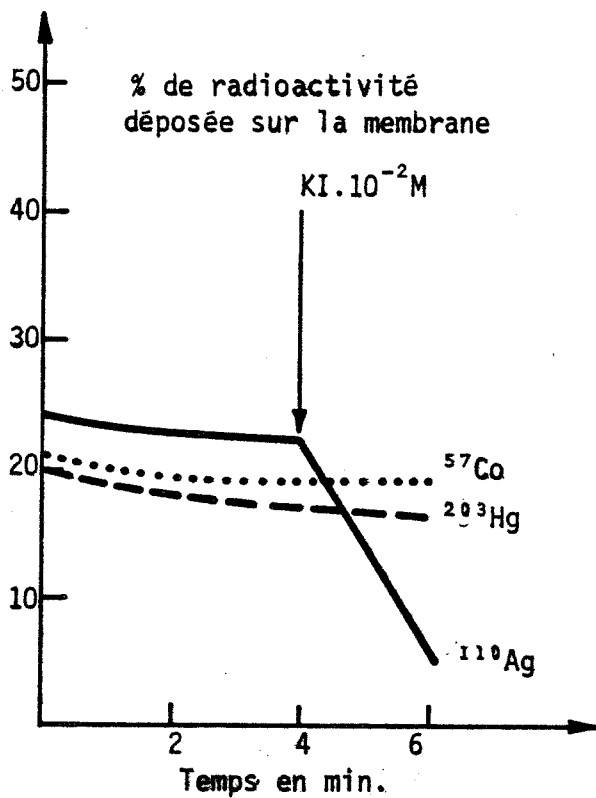
IV-5-1 - CAPTEUR POUR LE DOSAGE DES IONS METALLIQUES

Nous avons montré qu'une électrode à pCO_2 recouverte d'une membrane d'uréase et raccordée à un millivoltmètre permet par l'inhibition de l'enzyme la détection des ions métalliques tels que Hg^{2+} , Ag^+ ou Co^{2+} .

Le principe de la mesure est donc extrêmement simple. Il suffit de plonger l'électrode enzymatique dans le milieu à doser pendant un temps correspondant à l'incubation choisie. L'activité résiduelle est ensuite comparée avec une courbe d'étalonnage établie dans le même milieu et dans les mêmes conditions de mesure.

Les figures 67, 68 montrent les courbes d'étalonnage obtenues dans un milieu tampon pH 7,4 pour les ions Hg^{2+} et Ag^+ . En faisant varier le temps d'incubation et la concentration d'enzyme au niveau de la membrane il est possible comme nous l'avons montré, de déplacer le seuil de détection de l'électrode afin de l'adapter au domaine de concentrations propice au dosage. De plus, quand on peut contrôler le pH du milieu à doser on peut favoriser l'inhibition en travaillant à des pH basiques.

La régénération de l'électrode enzymatique inhibée par les ions métalliques est un moyen de donner à l'analyse un caractère sélectif. En effet, l'étude individuelle de l'action des ions sur l'enzyme a montré que l'inhibition pouvait être levée au moyen de solutions de NH_4S pour le mercure, de KI pour l'argent et d'un mélange d'acide glutamique - KCN ou d'EDTA pour le cobalt (52).



Fixation d'un mélange de 3 ions (⁵⁷Co²⁺, ²⁰³Hg²⁺, ¹¹⁰Ag⁺) sur des membranes d'uréase.

Figure 69 - Traitement en continu des membranes KI.10⁻²M

Figure 70 - Traitement en continu des membranes par NH₄S 10⁻⁴M

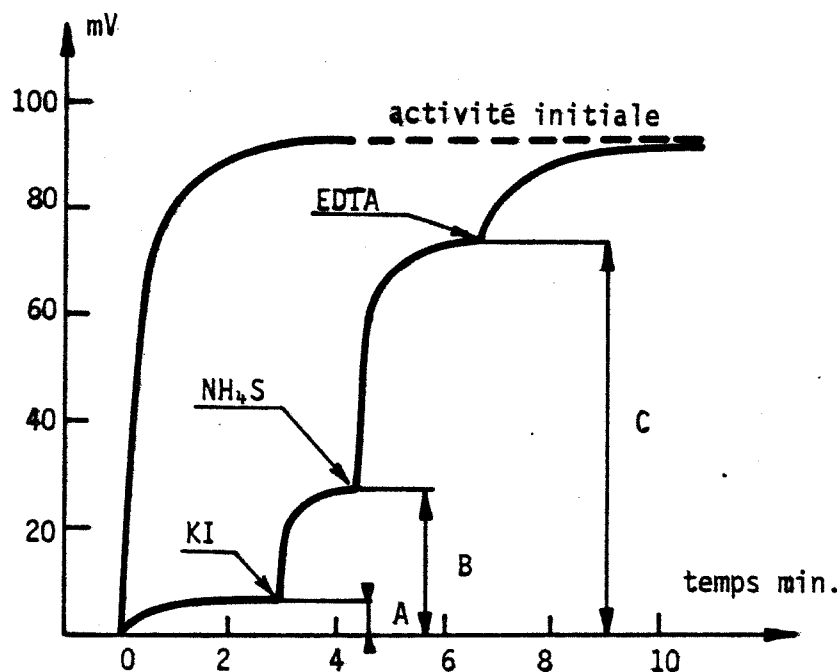


Figure 71 - Réponse du capteur à uréase après régénérations successives de la membrane inhibée par un mélange de 3 ions $\text{Co}^{2+} 10^{-6}\text{M}$, $\text{Ag}^+ 10^{-6}\text{M}$ $\text{Hg}^{2+} 5.10^{-7}\text{M}$ - temps d'incubation : 15 min - membrane 17 UI.

- A inhibition $\text{Co}^{2+} + \text{Hg}^{2+} + \text{Ag}^+$
- B inhibition $\text{Co}^{2+} + \text{Hg}^{2+}$
- C inhibition Co^{2+}

Si l'EDTA ($10^{-3}M$) a le pouvoir de complexer les trois ions et de régénérer globalement la membrane, les actions du sulfure d'ammonium et de l'iodure de potassium sont plus sélectives. Sur les figures 69 et 70 représentant la radioactivité individuelle des trois ions fixés sur des membranes d'uréase au cours du lavage on constate qu'avec une solution de NH_4S ($10^{-4}M$) le lavage entraîne la désorption rapide du mercure et de l'argent alors que le cobalt reste fixé. D'une façon analogue, avec une solution de KI ($10^{-2}M$) le lavage fait désorber uniquement l'argent ; le cobalt et le mercure ne sont pas touchés et demeurent sur la membrane. On voit alors l'intérêt d'une telle sélectivité lors d'un dosage dans un milieu contenant un mélange des trois ions. Après incubation de l'électrode dans le mélange, la première mesure d'activité enzymatique résiduelle traduit l'inhibition globale due à l'action des trois ions.

Le processus de régénération peut se faire suivant trois étapes :

- 1) Le premier lavage avec KI permet de désorber l'argent et régénère une partie de l'activité enzymatique, donnant ainsi lieu à un nouveau palier d'équilibre où l'inhibition de l'électrode enzymatique provient de la présence de Co^{2+} et de Hg^{2+} .
- 2) Un deuxième lavage avec NH_4S élimine le mercure ; d'où un nouveau palier de potentiel correspondant à l'inhibition unique du cobalt.
- 3) La régénération totale de la membrane se fait alors à l'aide d'une solution d'EDTA.

La figure (71) montre les différentes étapes du dosage lors de l'addition des antidotes et les réponses correspondantes de l'électrode.

On sait que les ions lourds peuvent être déterminés aisément par les techniques analytiques conventionnelles telles que la spectroscopie d'absorption atomique. Récemment OGREEN et MATTIASSON (104) (105) rapportent une méthode analytique du mercure utilisant des enzymes immobilisées. Leur technique de mesure par thermistance faisant appel à l'usage d'un réacteur dans lequel l'enzyme est immobilisée sur des billes ou sur une colonne poreuse demande un appareillage complexe qui n'a plus le caractère d'un capteur, mais d'une chaîne d'analyse de laboratoire. Nous pensons que le développement d'un système analytique tel que

nous le décrivons ici offre l'avantage d'une simplicité incomparable qui lui permet de travailler sur le "terrain" même. Ses possibilités ne sont pas limitées à la détection de ces trois ions et l'étude a pu être étendue à la détection du cuivre et du cadmium. SHAW ⁽¹⁹⁾ a montré dans son étude de l'enzyme en solution que les ions Zn^{2+} , Ni^{2+} et Pb^{2+} pouvaient être également des inhibiteurs de l'uréase. Une étude plus systématique serait donc nécessaire pour définir les conditions optimales de travail pour chaque ion en faisant appel aux principes des méthodes de séparation analytique.

Rappelons également ⁽⁵²⁾ qu'il est possible grâce à l'emploi des radiotraceurs associé aux membranes enzymatiques de développer une méthode analytique dite par dilution isotopique substoechiométrique permettant le dosage des ions métalliques à l'état de trace.

IV-5-2 - CAPTEURS DES PARASYMPATHICOMIMETIQUES ET DES PESTICIDES

Les parasympathicomimétiques ou encore anticholinestérasiques sont des substances employées aussi bien comme médicaments que comme gaz de combat ou comme insecticides. Elles agissent toutes au niveau du système nerveux central et végétatif par blocage du catabolisme de l'acétylcholine. L'intoxication entraîne donc selon le corps utilisé et surtout la dose administrée des effets dits parasympathicomimétiques qui évoluent en deux phases : une phase d'hyperexcitation (c'est la phase muscarinique) puis une phase de paralysie musculaire puis respiratoire traduisant une forte accumulation d'acétylcholine (c'est la phase nicotinique).

a) Les médicaments

Rappelons seulement ici les produits utilisés en clinique et la dose létale (DL) pour les principaux d'entre eux :

- Eserine ou physostigmine : DL = 6 mg
- Prostigmine ou néostigmine : DL = 60 mg
- Pyridostigmine ou Mestinon
- Edrophonium ou Tensilon
- Ambrémonium ou Mytélase : dont l'intoxication est très grave surtout chez l'enfant (DL = 20 à 30 mg).

Comme nous l'avons montré dans cette étude la plupart des substances ci-dessus sont des inhibiteurs réversibles rapides de la cholinestérase. Cependant leur grande toxicité provient de leur effet sur l'organisme pour de très faibles concentrations, comme l'ont prouvé les courbes de dosage de l'éserine et de la néostigmine données par le capteur au paragraphe (IV-2-2) constitué par l'électrode de verre sur laquelle est greffée une membrane de cholinestérase. Cette électrode d'AChE qui répond linéairement jusqu'à des concentrations proches de 10^{-8} Mole/l quantité difficilement détectable par des méthodes chimiques courantes, soit de l'ordre de 3 ppb (approximativement 3 ng/ml), peut être un instrument précieux aussi bien pour le clinicien en contrôle thérapeutique que pour le biologiste pour des études pharmacologiques.

b) Les pesticides

La lutte contre les insectes, vitale pour l'homme emploie un arsenal toxicologique fourni. Cette branche de la chimie a bénéficié d'un effort scientifique intensif stimulé notamment par les besoins de la dernière guerre mondiale. Les produits proposés évoluent pour atteindre une plus grande efficacité, mais parallèlement ils présentent un danger accru pour l'homme. Il convient donc d'en contrôler les effets et de pouvoir y parer.

On a pu montrer grâce à l'électrode d'AChE la toxicité de la nicotine, alcaloïde employée et incorporée à des poudres mais surtout en pulvérisations ou "atomisations" de solution à 1 % de sulfate de nicotine et en fumigation. Malgré sa toxicité pour l'homme elle est encore l'objet d'un assez large emploi dans l'horticulture et la floriculture.

Les progrès récents portent spécialement sur les *insecticides de contact*: grâce à leur solubilité dans les graisses, ils peuvent atteindre et tuer un insecte qui n'a pris contact avec une de leurs particules que par un bout de patte, une antenne, un point quelconque de son revêtement riche en lipides. Les intoxications aiguës les plus graves et les plus fréquentes sont le fait des organophosphorés utilisés comme pesticides, car outre les risques d'ingestion ou respiratoire, leur pénétration dans l'organisme par voie cutanée en font des substances redoutables difficiles à combattre. Aussi les études pour leur détection et leur dosage dans l'environnement se sont multipliées ⁽⁹⁶⁾. Malheureusement ce sont des substances toxiques à l'état des traces et les méthodes analytiques disponibles ne sont pas

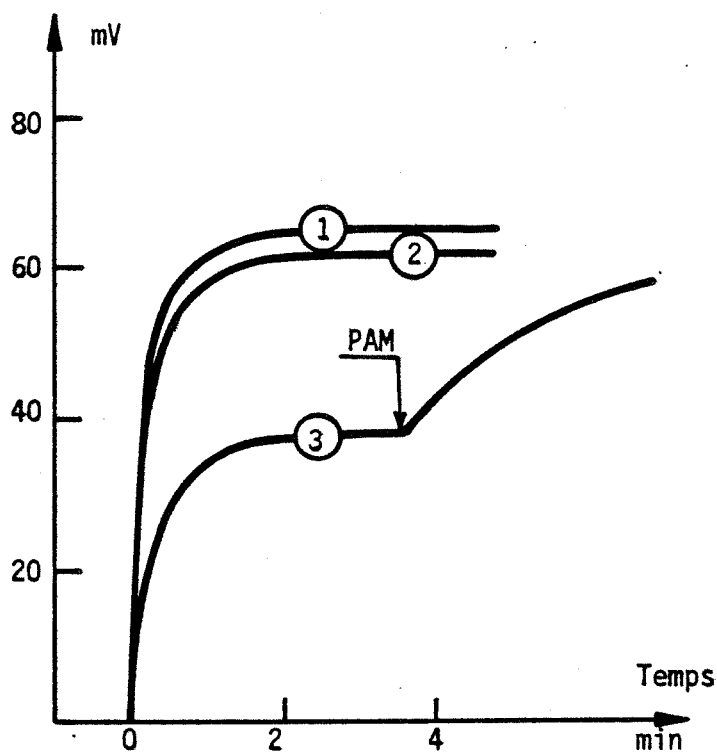


Figure 72 - Comparaison de la réponse d'une électrode à AChE inhibée par l'éthyl parathion avant et après activation par l'eau de brome

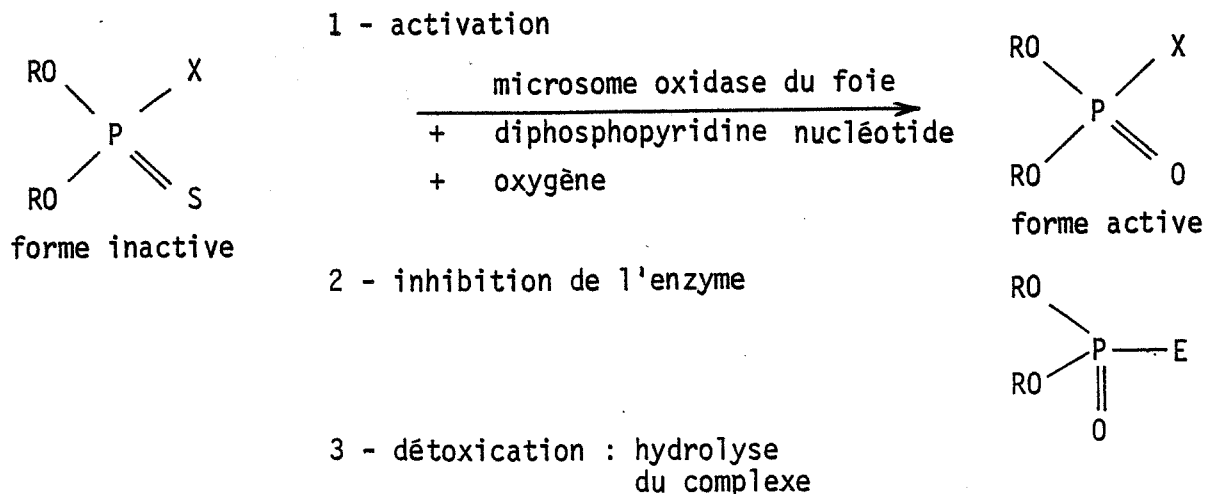
- 1 activité sans inhibiteur
- 2 activité en présence d'éthyl parathion $3.29.10^{-6}$ dans hexane temps d'incubation 25 min.
- 3 activité en présence d'éthyl parathion après oxydation temps d'incubation 5 min.

toujours performantes ou font appel à des techniques très élaborées : chromatographie en phase gazeuse (106) (107 a-b), capture d'électron (108). Devant ces difficultés divers auteurs ont cherché à doser ces composés polluants par mesure de l'activité de la cholinestérase en solution au moyen des méthodes classiques présentant les inconvénients énoncés en début de ce chapitre (34) (109 a-b) (110) (111) (112) (113) (114) (115). Ainsi l'une des méthodes officielles retenue (INRA) pour évaluer la présence d'insecticides dans les végétaux utilise une analyse par chromatographie sur couche mince au moyen de la cholinestérase de têtes de mouches broyées. Cette analyse semi quantitative des organophosphorés ne permet pas de mesures en continu, ni d'automatisation, de plus un laboratoire est nécessaire ainsi qu'un élevage de mouches.

L'étude de l'action du paraoxon sur la membrane d'AChE immobilisée nous a montré la sensibilité de l'électrode enzymatique à ce composé. Grâce à la PAM qui régénère rapidement l'activité enzymatique il est possible d'utiliser cette électrode comme capteur des organophosphorés. La courbe de dosage (figure 50) est pratiquement linéaire jusqu'à des concentrations inférieures au micromole par litre. La régénération de l'électrode s'effectue par simple lavage avec une solution tampon contenant du PAM 10^{-4} . Une augmentation de la concentration en PAM dans la solution de lavage facilite encore la dissociation du complexe et permet une régénération plus rapide.

Oxydation des composés soufrés

En pratique tous les insecticides organophosphorés sont des thio ou dithiophosphates. Ces composés sont pratiquement insolubles dans l'eau, mais solubles dans les graisses. De plus, in vivo ils sont activés en leur analogue oxygéné pour inhiber l'enzyme.



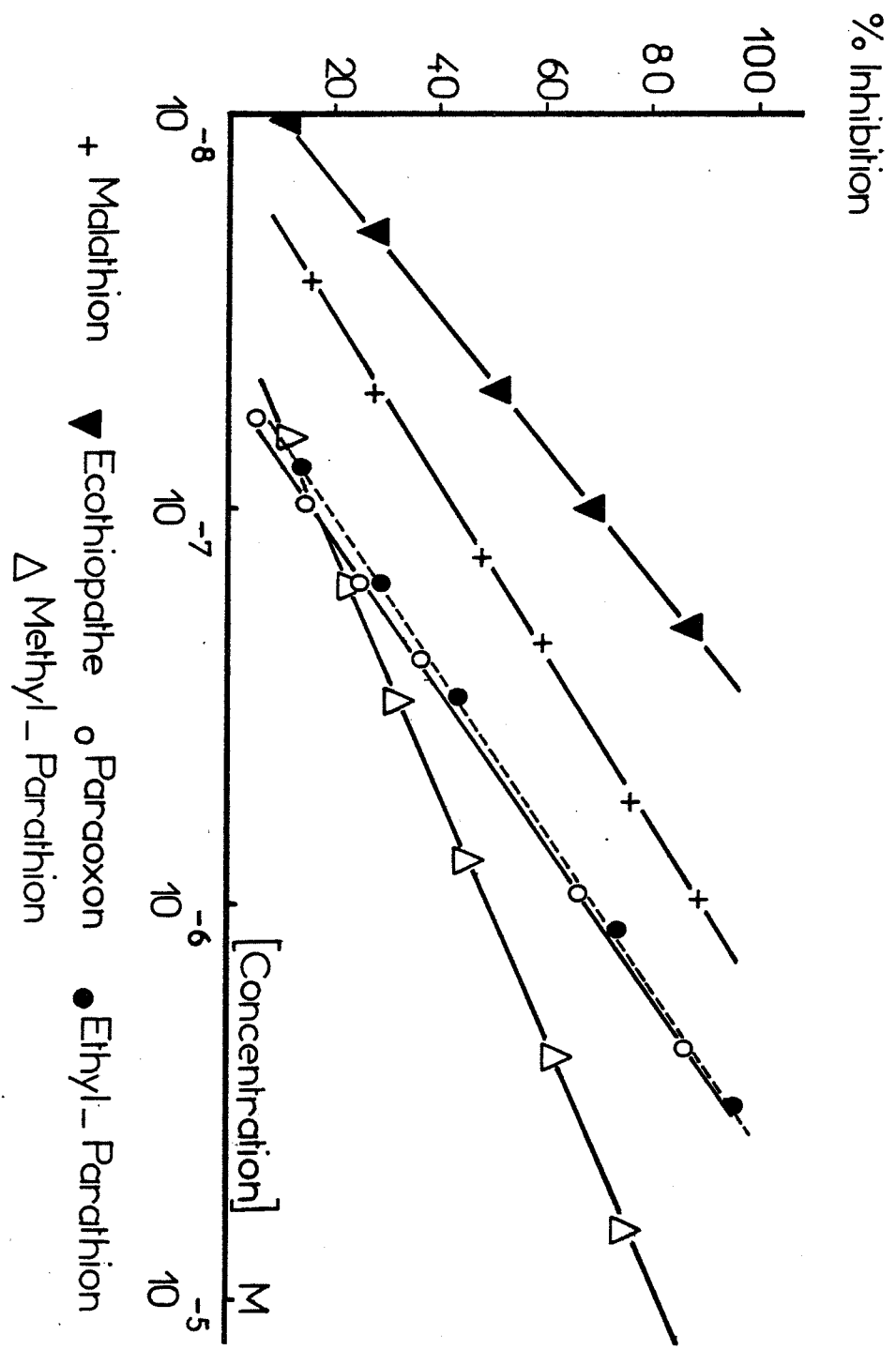


Figure 73 - Variation du pourcentage d'inhibition d'une électrode d'AChE en fonction de la concentration de différents organophosphorés

Ceci explique la raison pour laquelle le paraoxon agit immédiatement sur la membrane enzymatique alors que le parathion éthyl son homologue soufré est pratiquement sans effet. D'une part le parathion est insoluble en phase aqueuse, d'autre part le composé soufré n'est pas actif.

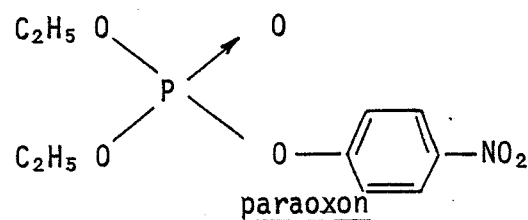
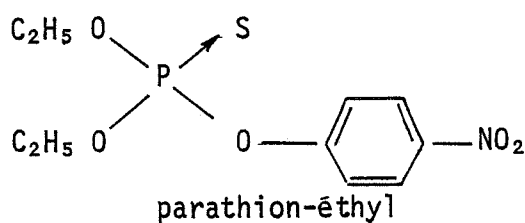
Nous avons donc été conduit à activer ces composés avant de les faire agir sur l'enzyme. Diverses méthodes d'oxydation peuvent être employées :

- oxydation par H_2O_2 /acide acétique (116)
- acide nitrique concentré et fumant (117)
- N-bromosuccinimide (118)
- acide m-chlorobenzoïque (119).

Nous avons choisi d'utiliser une méthode d'oxydation à l'eau de brome. Les autres méthodes présentant l'inconvénient d'être relativement longue, de chauffer les solutions d'organophosphorés ou d'utiliser des produits organiques affectant la membrane enzymatique. D'autre part cette méthode a l'avantage de faire passer l'organophosphoré de la phase organique à une phase aqueuse propice au dosage.

On extrait l'organophosphoré soufré de l'échantillon à l'aide d'un mélange Hexane-acétone 50/50 qui est ensuite évaporé sous vide. On ajoute 1 ml d'une solution saturée d'eau de brome au résidu sec et l'on agite jusqu'à ce que la solution devienne claire. L'organophosphoré passe sous forme oxydée dans la solution. On peut alors diluer la solution selon les besoins avec une solution tampon. Les contrôles ont montré que le brome libre contenu dans la solution à cette concentration ne provoque aucune perturbation sur l'activité enzymatique. La figure (72) permet de comparer l'action inhibitrice du parathion éthyl avant et après oxydation sur l'électrode enzymatique.

Sur la figure (73) la courbe de dosage du parathion-éthyl oxydé par notre méthode et celle du paraoxon initial sont parfaitement superposables. Elles démontrent que l'oxydation du produit soufré à ces concentrations est totale et que les deux substances sont semblables.



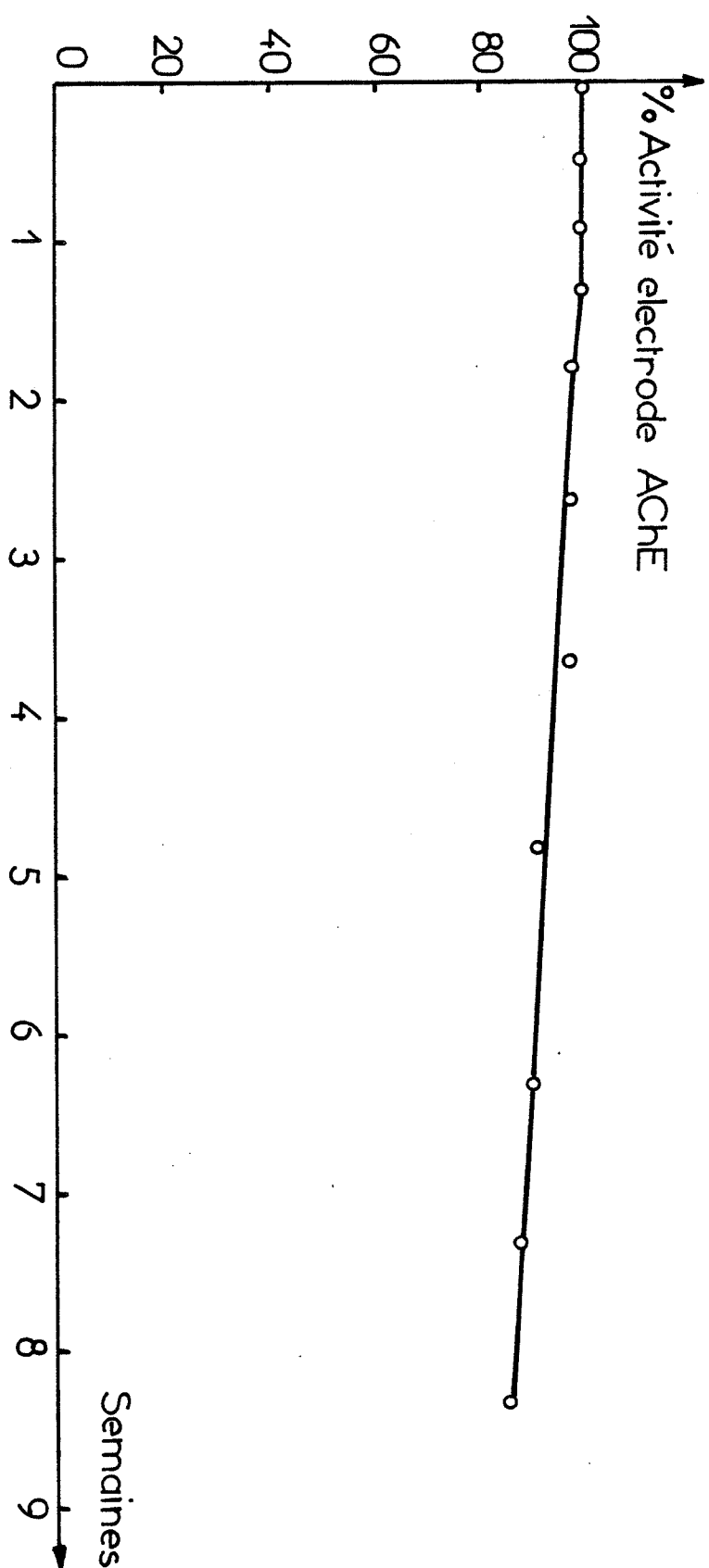


Figure 74 - Evolution de l'activité enzymatique de l'électrode à ACHe au cours du temps.

On procède de la même manière pour extraire et oxyder tous les autres pesticides soufrés tels que le malathion ou le parathion méthyl, etc ... Cette méthode permet l'extraction de ces composés à partir d'échantillons contaminés tels que les légumes, les fruits, viande, échantillon de sol ou serum. Le tableau suivant donne l'exemple des limites de détection des dosages de divers organo-phosphorés effectuées à partir d'extrait d'herbe contaminée (120).

Pesticides	Seuil de detection en ppb
PARAOXON	14
METHYL PARATHION	8
ETHYL PARATHION	14,5
MALATHION	4
ECOTHIOPATHE	2,5

Il nous reste à voir la durée de vie des capteurs enzymatiques lorsque ceux-ci sont soumis à l'action des inhibiteurs. La figure (74) montre que l'électrode à AChE garde 80 % de son activité enzymatique après plus de deux mois d'utilisation à 25°C.

CONCLUSION : Il est possible d'utiliser les électrodes à enzymes fixées comme capteur pour la détection et le dosage des composés toxiques. Cette technique analytique reprend le principe de l'inhibition des enzymes de notre organisme au cours de son empoisonnement par des dérivés polluants.

Si dans le cas du capteur à uréase il est possible d'obtenir une sélectivité pour le dosage des ions métalliques grâce à sa régénération, dans le cas du dosage des dérivés organophosphorés et de l'acide carbamique cela est plus difficile à l'aide du capteur à cholinestérase. Mais notre but n'est-il pas d'abord de protéger notre organisme par une connaissance du niveau de la toxicité globale de tous les composés qui nuisent à son existence ? Le principe de ces capteurs présente en particulier, l'avantage de doser les polluants selon leur pouvoir d'inhibition des réactions enzymatiques, ce qui leur confère une sensibilité supérieure aux autres techniques de détection courantes.

V-CONCLUSION

L'utilisation des enzymes artificiellement incorporées dans des membranes est la première étape qui peut traduire à une échelle macroscopique les phénomènes d'inhibition se déroulant dans les membranes naturelles biologiques. Le greffage de ces membranes artificielles actives sur des électrodes spécifiques sensibles aux produits de réaction est un moyen de mesurer en continu l'activité enzymatique au contact même de la paroi membranaire. Parallèlement, l'emploi des traceurs radioactifs est une méthode non destructive d'identifier et de suivre à l'échelle des traces la concentration des inhibiteurs au sein de la membrane enzymatique.

L'étude de l'uréase et de la cholinestérase immobilisées a permis de dégager la nature réelle des inhibiteurs de ces enzymes qui jusqu'alors n'était connue qu'en solution. Grâce à une séparation facile de l'enzyme immobilisée et de la solution inhibitrice, la notion de réversibilité et d'irréversibilité a pu être précisée d'une façon certaine.

Les ions métalliques lourds inhibant l'uréase à l'état de trace n'ont pas un effet instantané sur l'enzyme immobilisée. La vitesse de réaction est lente et a souvent besoin d'un certain temps d'incubation. Dans le cas de l'argent, la membrane révèle une inhibition tardive, même après la disparition de l'inhibiteur du milieu dans lequel elle se trouve. De plus, contrairement à l'idée établie dans la littérature, nous avons démontré que l'argent est un inhibiteur réversible.

Le support membranaire constitué par l'albumine s'est révélé être un protecteur de l'enzyme face aux inhibiteurs, que ce soit les carbamates vis-à-vis de la cholinestérase ou les ions métalliques vis-à-vis de l'uréase. Cela explique l'élévation de la limite de détection des inhibiteurs obtenus par rapport aux résultats de certains auteurs avec les enzymes en solution aqueuse. Toutefois, il ne faut pas perdre de vue que l'organisme est riche en albumine et que les enzymes, outre ceux constituant des membranes cellulaires, demeurent fixées à des protéines porteuses, de sorte qu'en solution on est loin de la réalité physiologique.

L'action des inhibiteurs réversibles est instantanément démontrée par la réponse de l'électrode enzymatique, aussi bien pour les compétitifs comme la nicotine ou l'arginine sur la cholinestérase que les incompétitifs comme le fluor. L'étude de l'inhibition, au moyen de cette technique utilisable en continu pendant un temps suffisamment long a permis de mettre en évidence l'action réversible des organophosphorés sur la cholinestérase. Un mécanisme d'inhibition reposant sur la formation de deux complexes intermédiaires est vérifié expérimentalement grâce à l'étude cinétique de la régénération spontanée de l'enzyme inhibée par du paraoxon marqué au ^{32}P et détecté par effet Cerenkov. Cette méthode ouvre la voie à l'étude cinétique de régénération spontanée des enzymes inhibées qui fait défaut dans la littérature faute de moyen rapide de séparation de l'enzyme et de l'inhibiteur.

Dans le cas de l'inhibition irréversible des méthodes de régénération artificielle des membranes inhibées sont développées utilisant l'association des électrodes enzymatiques et des radiotraceurs. On dispose là d'un bon moyen d'étude pharmacologique pour la recherche d'antidote spécifique des toxiques.

Dans la préparation industrielle d'enzymes immobilisées, de nombreux chercheurs se préoccupent de fabriquer des réacteurs au rendement maximal. Peu se sont soucié de l'action des inhibiteurs (souvent à l'état de traces dans les produits naturels traités) pouvant empoisonner le catalyseur au cours de son fonctionnement. Ces inhibiteurs ont pour effet de réduire la vie du réacteur, souvent attribuée à une dénaturation de l'enzyme. Cette étude sur la régénération est l'occasion de montrer qu'une enzyme fixée a une résistance remarquable et qu'un traitement approprié peut lui redonner toute son efficacité.

Un modèle permettant d'expliquer le comportement de ces membranes enzymatiques greffées sur les électrodes est ensuite étudié. L'analyse théorique de diffusion réaction en présence des inhibiteurs a permis de tracer les profils de concentration des métabolites en régime d'évolution à travers la membrane enzymatique, et ainsi de définir et de contrôler les paramètres affectant son activité vis-à-vis des substrats et des inhibiteurs. Cela nous a conduit à définir les conditions de fonctionnement des capteurs enzymatiques aussi bien pour le substrat que pour l'inhibiteur.

Nous avons concrétisé cette étude par la réalisation d'une électrode sensible à l'acétylcholine. Elle constitue l'un des premiers capteurs des neurotransmetteurs. Son application expérimentale in situ au niveau du cerveau intéresse les neurobiologistes actuellement démunis de moyen de mesure sélectif en continu des neurotransmetteurs. De même l'utilisation de l'électrode à uréase pour le dosage de l'urée sérique est envisageable maintenant malgré la présence des ions fluorures qui évitent la glycolyse ⁽¹²¹⁾.

Nous avons démontré la possibilité et l'intérêt d'utiliser les capteurs à enzymes immobilisées pour la détection et le dosage des drogues, des ions métalliques lourds et des pesticides à l'état des traces. Leurs performances alliées à leur simplicité d'utilisation en font des instruments tout indiqués pour travailler sur le "terrain". Ils sont applicables dans de nombreux domaines, notamment en médecine ou pour le contrôle de l'environnement. Cette technique analytique reprend le mécanisme des organismes vivants soumis à l'action de leurs propres inhibiteurs et simule les phénomènes d'empoisonnement.

Si parfois, la sélectivité lui fait défaut, cette technique présente par contre l'avantage de mesurer les composés nocifs suivant la même échelle de toxicité que notre organisme. L'élément de base n'est pas limité aux électrodes et doit être adapté suivant les produits et les caractéristiques de la réaction enzymatique ⁽¹²²⁾. Une prospection systématique des enzymes sensibles aux inhibiteurs peut élargir le domaine d'application de cette méthode analytique. Un choix judicieux de l'origine de l'enzyme et même de l'isoenzyme devrait permettre d'améliorer la spécificité et la limite de détection de cette méthode.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) J. LEYDEN WEBB : Enzyme and Metabolic Inhibitors, 1963, Academic Press New-York.
- (2) E. KATCHALSKI : Symp. Funct. Biol. Syst. Macromol. Level. Proc. Nobel Symp. Publi., 1969, 283-304.
- (3) MC. LAREN-PACKER : Adv. Enzymol., 1970, 33, 245-308.
- (4) MOSBACH : Immobilized Enzymes. Methods in Enzymology, 1976, Acad. Press. New-York, vol. 44.
- (5) A.D. MC LAREN : Soil as a system of bound enzymes, Chem. Ind., 1974, 7, 316.
- (6) O.R. ZABORSKY : Immobilized enzymes, CRC Press, sept., 1974.
- (7) V. HENRI : Lois générales d'action des diastases, Hermann, Paris, 1903.
- (8) L. MICHAELIS, M.L. MENTEN : Biochem. Z., 1913, 49, 333.
- (9) G.E. BRIGGS, J.S. HALDANE : Biochem. J., 1925, 19, 338.
- (10) L. PENASSE : Les enzymes, cinétique et mécanisme d'action, Masson à Cie, 1974.
- (11) T.E. BARMAN : Enzyme Handbook, Vol. 2, 11023, 1969.
- (12) J. RICARD : Cinétique et Mécanismes d'action des enzymes : Cinétique enzymatique phénoménologique, DOIN, Paris, 1973.
- (13) L. MARTIN : Bull. Johns Hopk Hosp., 1933, 52, 166.
- (14) J.B. SUMMER : The enzymes, 1951, 1, 886.
- (15) THOMAS & BARMAN : Enzyme Handbook, 1969 (vol. 1
- (16) C. TRAN MINH : Thèse, Rouen, 1971, n° 6262.
- (17) C. TRAN MINH, G. BROUN : Analytical Chemistry, 1975, 47, 1359.
- (18) R. GUYONNET, C. TRAN MINH, J. BEAUX : C.R. Acad. Sciences, 286, série C, 1978, p. 115.
- (19) W.H.R. SHAW : J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 2160.
- (20) W.H.R. SHAW et D.N. RAVAL : J. Am. Chem. Soc., 1961, 83, 3184.
- (21) R.B. HUGHES, S.A. KATZ, S.E. STUBBINS : Enzymologie, 1969, 36, 332.
- (22) E.C. TOREN, F.J. BURGER : Mikrochim. Acta, 1968, 1049.

- (23) I. WILSON, F. BERGMAN : J. biol. Chem., 1950, 185, 479.
J. Biol. Chem., 1950, 186, 683.
- (24) J. CARTAUD, F. RIEGER, S. BON, J. MASSOULIE : Brain Research, 1975, 88, 127-130.
- (25) J. MASSOULIE, S. BON, F. RIEGER, M. VIGNY : Croatica Chem. Acta, 1975, 47, 163-179.
- (26) I.B. WILSON, C. QUAN : HBB, 1958, 73, 131.
- (27) F. BERGMANN, M. WURZEL : BBA, 1954, 13, 251.
- (28) A. GOLDSTEIN : J. Gen. Physiol., 1944, 27, 529.
- (29) A. GOLDSTEIN, O. KRAYER, M.A. ROOT, G. ACHESON, M.E. DOHERTY : J. Pharmacol. Exptl. Therap., 1949, 95, 102.
- (30) W.N. ALDRIDGE : Biochem. J., 1950, 46, 451-460.
- (31) W.N. ALDRIDGE : Biochem. J., 1953, 54, 442-448.
- (32) B.W. WILSON, C.R. WALKER : Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 8, 3194-3198.
- (33) L.A. MOUNTER, V.P. WHITTAKER : Biochem. J., 1953, 53, 167.
- (34) P.A. GIANG, S.A. HALL : Anal. Chem., 1964, 23, 1830-1834.
- (35) A.L. GREEN : Biochemical Pharmacology, 1958, 1, 115-128.
- (36) J.E. CASIDA : J. Agr. Chem., 1956, 4, 772-785.
- (37) A.C. BOYER, L.J. BROWN, M.B. SLOMKA, C.H. HINE : Toxicol. and Applied Pharmacol., 1977, 41, 389-394.
- (38) B.J. JANDORF, E.A. CROWELL, A.P. LEVIN : Fédération Proceeding, 1955, 14, 231.
- (39) H.O. MICHEL, E.C. GORDON, J. EPSTEIN : Environm. Sc. and Technol., 1973, 7, 11 1045.
- (40) V. HENRI : C.R. Acad. Science, 1906, 142, 97-100.
- (41) E. KATCHALSKI : Chem. Eng. Newo, 1971, 2, 86-87.
- (42) G. MANECKE : In Enzyme Engineering, Wiley, Interscience, 185-187.
- (43) G.R. STARK : Biochemical aspects of reactions on solid supports, Academic Press, 1971.
- (44) I.H. SILMAN, E. KATCHALSKI : Ann. Rev. Biochem., 1966, 35, 837-908.
- (45) G. KAY : Process Biochem., 1968, 3, 11, 36-39.
- (46) H.D. ORTH, W. BRUMMER : Augerw. Chem. Inst. Ed. England, 1972, 11, 249.
- (47) E. SELEGNY : "Some systems coupling enzymic reactions and other phenomena" Polyelectrolytes Reidel Publ. Co Dordrecht Hull, 1974.
- (48) S. BROUN, AVRAMEAS, E. SELEGNY, D. THOMAS : Biochem. Biophys. Acta, 1969, 185, 260.

- (49) G. BROUN, E. SELEGNY, C. TRAN MINH et D. THOMAS : FEBS Letters, 1970, 7, 3 223.
- (50) A.C. KOCH-SCHMIDT, K. HOSBACH : Biochemistry, 1967, 16, 2105-2109.
- (51) P. MONSAN : Thèse, Toulouse, 1977
- (52) R. GUYONNET, DEA, Physique Nucléaire, Lyon, 1976.
- (53) G. SIMONNET, M. ORIA : Les mesures de radioactivité à l'aide des compteurs à scintillateur liquide, Eyrolles Ed., 1976.
- (54) K. KAWASHIMA, K. UMEDA : Biotechnol. et Bioengineering, XVI, 1974, 609-621.
- (55) W. DALE : Biochem. J., 1940, 34, 1367 - 1942, 36, 80
J. physiol., 1943, 102, 50.
- (56) A. FORSSBERG : Acta Radiol., 1946, 27, 281.
Nat., 1947, 159, 308.
- (57) G.A. MORTON, H.M. SMITH, R. WASSERMANN : I.E.E.E. Trans. Nucl. Sci. Ns, 1967, 14, 443.
- (58) R.H. EBRICK, R.P. PARKER : Int. J. Appl. Rad. Isot., 1966, 17, 361.
- (59) A. LAUHLI : Int. J. Appl. Rad. Isotopes, 1969, 20, 265.
- (60) D. NACHMANSCHN, F. BERGMANN, J.B. WILSON : J. Biol. Chem., 1950, 186, 693.
- (61) I.B. WILSON et F. BERGMANN : J. Biol. Chem., 1950, 185, 479.
- (62) F. BERGMANN, SHIMONI : Biochem. Biophys. Acta, 1952, 9, 473.
- (63) G. CIMASONI : Biochem. J., 1966, 99, 133.
Revue Mens. Suisse d'Odonto Stomatol., 1969, 79, 2.
- (64) R.M. KRUPKA : Mol. Pharmacol., 1966, 2, 588, 569.
- (65) R. GUYONNET, C. TRAN MINH : C.R. Acad. Sci., 1978, 357, série C.
- (66) J. BEAUX, C. TRAN MINH : Anal. Chem. (sous presse), décembre 1978
- (67) C.M. KUNIN : Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1976, 10, 3, 503.
- (68) A. GOLDSTEIN, M.E. DOHERTY : Arch. Biochem. Biophys., 1951, 33, 35.
- (69) J.K. MARQUIS, G.O. WEBB : Molecular et Cellular Biochemistry, 1977, 16, 1.
- (70) J.B. SUMMER, Z. MYRBACK : Z. Physiol. Chem., 1930, 189, 218.
- (71) J.F. AMBROSE, G.B. KISTIAKOWSKI, A.G. KRIDL : J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 31.
- (72) J.F. AMBROSE, G.B. KISTIAKOWSKY, G.K. ANDREW : J. Am. Soc., 1951, 73, 1232.
- (73) J.K. COOK : J. Gen. Physiol., 1926, 27, 49.
- (74) J.L. WEBB : Enzyme and Metabolic Inhibitors - vol. 1, Academic Press, 1963.

- (75) C. ROBERT, Ph. D. WEAST : Handbook of Chemistry and Physics, CRC, 49^e Edition.
- (76) J.F. MARCKWORTH, E.C. WEBB : Biochem. J., 1948, 42, 91.
- (77) D. NACHMANSOHN, M.A. ROTHENBERG, E.A. FELD : J. Biol. Chem., 1948, 174, 247.
- (78) M.I. KABACHNIK, A.P. BRESTKIN, N.N. GODOVIKOV, M.J. MICHELSON, E.V. ROSENGART, V.I. ROSENGART : Pharmacological Review, 1970, 22, 3.
- (79) J. Cl. EVREUX, L. ROCHE, J. MOTIN, V. VINCENT : Précis de Toxicologie clinique, Masson Edition, 1968.
- (80) F. FABRE, R. TRUHAUT : Précis de Toxicologie, Sedes, Paris, 1971.
- (81) I.B. WILSON : J. Biol. Chem., 1951, 190, 110.
- (82) I.B. WILSON : J. Biol. Chem., 1952, 190, 113.
- (83) E.J. POZIOMEK, B.E. HACKLEY, J.G. STEINBERG : J. Org. Chem., 1958, 23, 714-717.
- (84) R. GUYONNET, C. TRAN MINH, F. LANCELOT : Capteurs à enzymes immobilisées pour le dosage des inhibiteurs - compte-rendu de fin d'études DGRST, Action complémentaire coordonnée "Chimie Analytique", n° 76-7-1521, décembre 1977.
- (85) A.F. CHILDS, D.R. DAVIES, A.L. GREEN, J.P. RUTTAND : Brit. J. Pharmacol., 1955 10, 462.
- (86) D.R. DAVIES, A.L. GREEN : Biochemical Journal, 1956, 63, 529.
- (87) A.L. GREEN, B. SALVILLE : Journal of Chemical Society, 1956, 756, 3887.
- (88) P. BARNETT, T. ROSENBERRY : J. Biol. Chem., 1977, 252, 20, 7200-7206.
- (89) I.B. WILSON, I. SILMAN : Biochemistry, 1977, 16, 12, 2701.
- (90) J.H. FLEISHER, H.O. MICHEL, L. YATES, C.S. HARRISON : J. Pharmacol. Exptt. Therap., 1960, 129, 31.
- (91) a - J.W. HOVANEK, C.A. BROOMFIELDS, G.M. STEINBERG, K.W. LANKS, C.N. LIESKE : Biochem. Biophys. Acta, 1977, 483, 312
b - Biochem. Biophys. Acta, 1977, 483, 320
- (92) J.P. KERNEVEZ : Thèse, Paris, 1972.
- (93) R.F. GOULD : Pesticides Identification at the residue level, Advances in Chem. series, ACS Washington, D.C., 1971.
- (94) R.D. O'BRIEN : "Toxic Phosphores Esters", Academic, New-York, 1960.
- (95) D.F. HEATH : "Organophosphores Poison", Pergamon, Oxford, 1961.
- (96) J.C. GAGE : Advance Pest. Control. Res., 1961, 4, 183.
- (97) W.N. FISHBEIN : The journal of Biological Chemistry, 1969, 244, 5, 1188.
- (98) K.B. AUGUSTINSSON : Methods of Biochemical Analysis, Vol. V, Interscience, New-York, London.
- (99) T.E. ARCHER, G. ZWEIG : J. Agr. Food Chem., 1959, 7, 178.

- (100) J.E. BEAM, D.J. HANKELSON : J. Dairy Science, XLVII, 1964, 1297.
- (101) G.G. GUILBAUT, D.N. KRAMER : Anal. Chem., 1965, 37, 1675.
- (102) G. BAUM : Anal. Biochem., 1971, 39, 65.
- (103) J. NEIL BALDRIDGE, D. NEIL JESPERSEN : Analytical Letters, 1975, 8 (9), 683.
- (104) L. OGREEN, G. JOHANSSON : Anal. Chim. Acta, 1978, 91, 1-11.
- (105) B. MATTIASSON, B. DANIELSSON, C. HERMANSSON, K. MOSBACH : FEBS Letters, 1978, 85, 2203.
- (106) D.M. COULSON, L.A. CAVANAGH, J.E. DEVRIES, B. WALTHER : J. Agr. Food. Chem. 1960, 8, 388.
- (107) a - J.E. LOVELOCK, S.R. LIPSKY : J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, 431.
b - J.E. LOVELOCK, S.R. LIPSKY : Anal. Chem., 1960, 33, 162.
- (108) S.J. CLARK : Gas Chromatographic Analysis of Pesticide Residues using the electron affinity detector, Jarrell, Ash Company, Newtonville, Massachusetts, 1961.
- (109) a - G.G. GUILBAULT, M.H. SADAR, S.S. KUAN, D. CASEY : Analytica Chimica Acta, 1970, 52, 75-82.
b - M.H. SADAR, S.S. KUAN, G.G. GUILBAULT : Analytical Chemistry, 1970, 42, 1770-1774.
- (110) R.L. SCHUTZMANN, W.F. BARTHEL : J. Assoc. Offic. Anal. Chemist., 1969, 52, 151.
- (111) J. BAGGAR, J. FUSIK, J. PATOEKA, V. HRDINA : Acta Biol. med. germ., 1977, 36, 231.
- (112) C.E. MENDOZA : Intern. J. Environ. Anal. Chem., 1974, 3, 171.
- (113) J.E. BEAM, D.J. HANKINSON : Dairy Sci. XLVII, 1964, 1297.
- (114) A.W. SEITZ, M.H. CHESTER : Analytical Letters, 1977, 10 (1), 11-19.
- (115) W.N. DAHL, A.M.R. HOLM, K.H. SCHROODER : Analytica Chimica Acta, 1977, 93, 91.
- (116) R. MISKUS, M.E. TZANAKAKIS, S.M. SMITH : J. econ. Entomol., 1959, 52, 76.
- (117) P.A. GIANG, S.A. HALL : Analytical. Chem., 1951, 23, 1830.
- (118) T.E. ARCHER, W.L. WINTERLIN, G. ZWEIG, H.F. BERKMANN : J. Agric. Food. Chem., 1963, 11, 471.
- (119) P.A. GRANG, M.J. SCHECHTER : J. Agric. Food Chem., 1966, 14, 380.
- (120) R. GUYONNET, C. TRAN MINH : Colloque "Journées d'étude sur les électrodes spécifiques à enzymes" - Toulouse, 12-13 Juin 1978, communication.
- (121) J. BEAUX, C. TRAN MINH : C.R. Acad. Sc. Paris, 1978, 287, série C 191.
- (122) D. VALLIN, C. TRAN MINH : Analytical Chemistry, 1978, 50, (13), 1874.

